



Universidade de Aveiro
Ano 2013/2014

Departamento de Química

José Miguel
Fiadeiro Lucas

Interação da proteína Blad do tremço com a
membrana plasmática de *Candida albicans*



**José Miguel
Fiadeiro Lucas**

**Interação da proteína Blad do tremço com a
membrana plasmática de *Candida albicans***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Sara Alexandra Valadas da Silva Monteiro, administradora e chefe do departamento tecnológico da Converde.

O júri

Presidente

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva (Orientador)
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino (Arguente)
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos Inevitavelmente, dedico este trabalho à minha família. Por mais palavras que tente, não há como descrever a moral e apoio prestado pelos meus pais, irmã e irmão.

Dedico também este trabalho à minha namorada, Inês. Um agradecimento muito especial por todo o apoio moral e psicológico que ela me deu.

Um agradecimento especial à Doutora Sara Monteiro e ao Professor Doutor Manuel António Coimbra, pela oportunidade que me foi concedida e por todo o apoio, atenção, conhecimento e disponibilidade prestada.

Um muito obrigado a todas as pessoas que me receberam e acompanharam diariamente na Converde. Agradeço imenso todo o apoio moral, técnico e todos os conhecimentos científicos que me transmitiram, nomeadamente, Ana Marques, Alexandra Carreira, André Barata, João Duarte, Margarida Pinheiro e Eliana.

Palavras-chave

polipéptido Blad, antifúngico, mecanismo de ação, *Candida albicans*, membrana plasmática, proteínas

Resumo

O objetivo principal do trabalho foi identificar os alvos potenciais de ligação do polipéptido Blad na membrana plasmática de *Candida albicans* que permitam elucidar o mecanismo de ação do polipéptido Blad responsável pela sua potente atividade fungicida.

O polipéptido Blad é um antifúngico obtido a partir do tremço de eficácia igual, ou superior, à dos fungicidas de síntese química existentes no mercado. O polipéptido Blad é um produto intermediário estável do catabolismo da β -conglutina, sendo um polipéptido de 20 kDa, composto por 173 aminoácidos, não glicosilado mas fosforilado e faz parte de uma proteína de 210 kDa.

Estudos anteriores efetuados com o fungo patogénico modelo, *Candida albicans*, revelaram que interfere com a estabilidade da membrana plasmática causando disrupção e inatividade metabólica. Por outro lado, ligando-se a estruturas glicosiladas também foi demonstrado que o polipéptido Blad possui atividade de lectina. Com base nisto, testou-se a hipótese do polipéptido Blad se ligar às proteínas glicosiladas da membrana plasmática de *C. albicans*, e deste modo desencadear um evento molecular/celular na membrana que leve à morte da célula.

Na totalidade dos ensaios de imunodeteção do polipéptido Blad na sua ligação às proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, verificou-se que este se liga a 9 proteínas com massa molecular aproximada de 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa (2), 25 kDa (2), 20 kDa, 15 kDa e 10 kDa.

No ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad, em que as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* foram desglicosiladas, parece existir alguma evidência que reforça a assunção do polipéptido Blad possuir atividade de lectina.

Após ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado a proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, estas foram isoladas e foram identificadas por espectrometria de massa. As proteínas identificadas com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad foram a enolase 1, álcool desidrogenase 1 e a subunidade beta da ATP sintetase, que são proteínas descritas na literatura como associadas à membrana plasmática de *C. albicans*, sendo que a sua função nesta localização celular é desconhecida.

Não foi possível realizar a análise das glicanas das proteínas associadas à membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade de ligação ao polipéptido Blad, que foram identificadas neste trabalho, devido a limitações experimentais.

Devido às limitações dos procedimentos utilizados neste trabalho, deve-se continuar a tentar, através de procedimentos mais sofisticados, a identificação de potenciais alvos de ligação do polipéptido Blad na membrana plasmática de *Candida albicans* que permitam elucidar o mecanismo de ação do polipéptido Blad responsável pela sua potente atividade fungicida.

Keywords

Blad polypeptide, antifungal agent, mechanism of action, *Candida albicans*, plasma membrane, proteins

Abstract

The main objective of this work was the identification of potential targets for the polypeptide Blad in the plasma membranes of *Candida albicans* cells. This knowledge will be a step forward in the elucidation of Blad polypeptide mode of action responsible for its powerful fungicide activity.

Blad polypeptide is a fungicide obtained from lupin and has fungicide potency under agricultural conditions equal or greater than that of their chemical counterparts. Blad polypeptide is a stable intermediate of β -conglutin catabolism, with 20 kDa, composed of 173 amino acids, non-glycosylated but phosphorylated and it is part of a protein of 210 kDa.

Previous studies performed with the model fungal pathogen, *Candida albicans*, revealed that Blad interferes with the fungus plasma membrane stability causing disruption and metabolic inactivity. In addition, binding to glycosylated structures it was also demonstrated that Blad polypeptide has lectin activity. Based on these two findings, in this work the hypothesis that Blad polypeptide binds to glycosylated proteins of the plasma membrane, unleashing a molecular/cellular event leading to cell death, was tested.

In the immunodetection assays of Blad polypeptide to its binding to the plasma membrane proteins of *C. albicans* it was found that it binds to nine proteins of approximate molecular mass of 75 kDa, 50 kDa, 37 kDa (2), two of 25 kDa (2), 20 kDa, 15 kDa and 10 kDa.

In the immunodetection assay of Blad polypeptide, in which the plasma membrane proteins of *C. albicans* were deglycosylated, there appears to be some evidence that strengthens the assumption of lectin activity of Blad polypeptide.

After immunodetection assay of Blad polypeptide bound to the plasma membrane proteins of *C. albicans*, these have been isolated and identified by mass spectrometry. The proteins identified with possible binding affinity to Blad polypeptide were enolase 1, alcohol dehydrogenase 1 and the beta subunit of ATP synthase, which are proteins described in literature as being associated with the plasma membrane of *C. albicans*, although its function in this cellular location is still unknown.

It was not possible to perform the analysis of glycans of the proteins associated with the plasma membrane of *C. albicans* with binding affinity to Blad polypeptide, which were identified in this work, due to experimental limitations.

Due to the limitations of the procedures used in this work it's important to continue to attempt, through more sophisticated procedures, the identification of potential binding targets of Blad polypeptide in the plasma membrane of *C. albicans*, allowing to elucidate the mechanism of action responsible for its potent fungicide activity.

Índice

| | |
|---|----|
| I – INTRODUÇÃO..... | 1 |
| I.1. A Converde/CEV e o seu fungicida biológico..... | 3 |
| I.2. Via biossintética do polipéptido Blad e caracterização das suas propriedades..... | 7 |
| I.3. Visão geral sobre os fungicidas..... | 11 |
| I.4. Membrana plasmática de fungos unicelulares (leveduras)..... | 13 |
| I.5. <i>Candida albicans</i> e a sua membrana plasmática..... | 15 |
| I.6. Exoglicoma e sua importância nas células..... | 18 |
| I.7 Os recetores de oligossacarídeos – Lectinas..... | 20 |
| I.8. Definição de <i>N</i> - e <i>O</i> - glicanas de glicoproteínas..... | 22 |
| I.9 Desglicolisação de <i>N</i> - e <i>O</i> -glicanas..... | 22 |
| I.10 Espectrometria de massa de glicanas..... | 23 |
| I.11. Efeitos morfológicos e fisiológicos provocados pelo polipéptido Blad em <i>C.albicans</i> | 26 |
| I.12. Extração e solubilização de proteínas membranares..... | 28 |
| I.13. Imunoprecipitação (IP)..... | 28 |
| I.13.1. Co-Imunoprecipitação (Co-IP)..... | 29 |
| I.14. Objetivos do trabalho..... | 30 |
| II – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 33 |
| II.1. Extração e isolamento do polipéptido Blad dos cotilédones das plântulas de tremçoço (<i>Lupinus albus</i>)..... | 35 |
| II.2. Quantificação das proteínas..... | 35 |
| II.3. Formação de esferoplastos de <i>Candida albicans</i> | 36 |
| II.4. Isolamento das membranas plasmáticas a partir de esferoplastos de <i>Candida albicans</i> | 37 |
| II.5. Ligação da Blad purificada à membrana plasmática de <i>Candida albicans</i> | 38 |
| II.6. Extração das proteínas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> | 38 |
| II.7. SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes..... | 38 |
| II.8. Focagem Isoelétrica..... | 39 |
| II.9. Coloração das proteínas em gel de poliacrilamida..... | 40 |
| II.9.1. Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250..... | 40 |

| | |
|---|--------|
| II.9.2. Coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250..... | 40 |
| II.9.3. Coloração com nitrato de prata..... | 41 |
| II.10. Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e ensaios de imunodeteção..... | 41 |
| II.11. Incubação das membranas de nitrocelulose com ácido periódico..... | 43 |
| II.12. Incubação das membranas de nitrocelulose a diferentes pH's..... | 43 |
| II.13. Co-Imunoprecipitação do polipéptido Blad conjuntamente com as proteínas de <i>C. albicans</i> com afinidade a este..... | 43 |
| II.14. Espectrometria de massa de proteínas..... | 45 |
| II.14.1. Digestão trípica em gel..... | 45 |
| II.14.2. Espectrometria de massa..... | 45 |
| II.14.3. Identificação das proteínas..... | 46 |
| II.15. Bioinformática..... | 46 |
| II.15.1. Ferramenta bioinformática Phyre..... | 46 |
| II.15.2. Ferramenta bioinformática 3DLigandSite..... | 48 |
| II.15.3. Ferramenta bioinformática STRING..... | 49 |
| II.15.4 Ferramenta bioinformática ClusPro..... | 50 |
| III – RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 53 |
| III.1. Formação de esferoplastos de <i>C. albicans</i> | 55 |
| III.2 Análise por SDS-PAGE das proteínas totais da membrana de <i>C. albicans</i> incubadas com o polipéptido Blad..... | 56 |
| III.3. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad..... | 58 |
| III.3.1. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total proteica da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> | 58 |
| III.3.2. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total das proteínas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> sujeitas a diferentes níveis de desglicosilação..... | 59 |
| III.3.3. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total proteica da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> sujeita a diferentes pH's, após incubação com o polipéptido Blad..... | 61 |
| III.4. Eletroforese bidimensional das proteínas totais da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> | 63 |

| | |
|--|-----|
| III.5. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total proteica da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> , com as proteínas previamente separadas por eletroforese bidimensional..... | 64 |
| III.6. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad através da sua co-imunoprecipitação com o polipéptido Blad..... | 66 |
| III.7. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad com o objetivo de posterior sequenciação por MS..... | 69 |
| III.8. Identificação por espectrometria de massa das proteínas, isoladas por imunoprecipitação, com afinidade ao polipéptido Blad..... | 70 |
| III.9. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad através de correspondência entre bandas imunodetetadas com as bandas presentes no perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> | 70 |
| III.10. Identificação por espectrometria de massa das proteínas, isoladas através de correspondência, com afinidade ao polipéptido Blad..... | 72 |
| III.11. Bioinformática..... | 77 |
| III.11.1. Ferramenta bioinformática Phyre..... | 77 |
| III.11.2. Ferramenta bioinformática 3DLigandSite..... | 78 |
| III.11.3. Ferramenta bioinformática STRING..... | 84 |
| III.11.4 Ferramenta bioinformática ClusPro..... | 84 |
| IV – CONCLUSÕES | 89 |
| V – BIBLIOGRAFIA | 95 |
| VI – ANEXOS..... | 111 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Instalações da unidade industrial da empresa CEV/Converde [foto fornecida pela Converde]..... | 3 |
| Figura 2. (A) Linha de produção industrial do Problad PLUS; (B) Zona de germinação do tremçoço (<i>Lupinus albus</i>); (C) Sementes de tremçoço (<i>Lupinus albus</i>) [fotos fornecidas pela Converde]..... | 4 |
| Figura 3. Ensaio de campo realizado sobre a eficácia do fungicida biológico ProBlad Plus no combate à infeção por <i>Botrytis</i> em tomateiros. [foto fornecida pela Converde]..... | 6 |
| Figura 4. (A) Representação da estrutura tridimensional do polipéptido Blad baseada numa simulação [efetuada com a ferramenta bioinformática Phyre]; (B) Sequência de aminoácidos do polipéptido Blad [Uniprot]..... | 7 |
| Figura 5. Imunofluorescência em <i>C. albicans</i> incubada com o polipéptido Blad durante 24 horas. O polipéptido Blad funciona como um antigénio; anticorpo primário anti-Blad produzido em coelho; anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra, conjugada com FITC. Filtro FITC (a), Filtro DAPI (b) e microscopia de campo claro (c). Barra corresponde a 10 µm..... | 27 |
| Figura 6. Imunofluorescência em esferoplastos de <i>C. albicans</i> incubados com o polipéptido Blad durante 24 horas. O polipéptido Blad funciona como um antigénio; anticorpo primário anti-Blad produzido em coelho; anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra, conjugada com FITC. Filtro FITC (a), Filtro DAPI (b) e microscopia de campo claro (c). Barra corresponde a 10 µm..... | 27 |
| Figura 7. SDS-PAGE referente ao ensaio da incubação das membranas plasmáticas de <i>C. albicans</i> , contendo as glicoproteínas desta, incubadas com Blad [1] Fração proteica total da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> (50 µg); [2] Blad purificada (50 µg); Tampão de lavagem após incubação das membranas de <i>C. albicans</i> com o polipéptido Blad: [3] 1ª lavagem (100 µL); [4] 2ª lavagem (100 µL); [5] 3ª lavagem (100 µL); [6] 4ª lavagem (100 µL); [7] 5ª lavagem (100 µL); [8] Fração proteica total da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> após incubação com Blad e após as lavagens (50 µg); [M] Marcador <i>Precision Plus Protein™ All Blue Standards</i> (kDa). Gel de acrilamida de 12,5%, corrido a 150 V..... | 57 |
| Figura 8. Ensaio de imunodeteção da Blad na fração total proteica da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> (50 µg)..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 9. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total das proteínas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> . [A] desglicosilação parcial das glicoproteínas (12,5 mM de ácido periódico durante 2 horas) (50 µg). [B] sem desglicosilação das glicoproteínas (50 µg). [C] desglicosilação total das glicoproteínas (100 mM de ácido periódico durante 1 hora) (50 µg)..... | 60 |
| Figura 10. Ensaio de imunodeteção da Blad após exposição da fração total proteica da membrana plasmática (50 µg) de <i>C. albicans</i> a diferentes pH's de solução de acetato de sódio: (A): 7.5 proteínas já extraídas da membrana; (B): 5; (C): 3. (A) – proteínas embebidas na membrana..... | 62 |
| Figura 11. Perfil das proteínas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> separadas por eletroforese bidimensional (200 µg)..... | 64 |
| Figura 12. Ensaio de imunodeteção da Blad nas proteínas totais da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> , previamente separadas eletroforese bidimensional (200 µg)..... | 65 |
| Figura 13. Ensaio de imunodeteção da Blad com desglicosilação total (100 mM de ácido periódico durante 2 horas) das proteínas totais da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> , separadas por eletroforese bidimensional (200 µg)..... | 66 |
| Figura 14. Análise por SDS-PAGE das proteínas totais da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> incubadas com Blad. [1] Fração proteica total da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> incubada com Blad (10 µg); [2] Anticorpo de coelho (5 µg); [3] Fração proteica total da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> após incubação com Blad e com o anticorpo de coelho/sobrenadante (10 µg); [4] Primeira eluição com tampão (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) (10 µg); [5] Segunda eluição com tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol (10 µg); [A] Proteína com afinidade ao polipéptido Blad; [B] Proteína com afinidade ao polipéptido Blad; [M] Marcador Precision Plus Protein™ All Blue Standards (kDa). Gel de acrilamida de 17,5%, corrido a 150 V. | 67 |
| Figura 15. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad nas amostras de: (1) Sobrenadante após incubação da fração total das proteínas previamente extraídas da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho e com as 'beads' magnéticas (50 µg); (2) Primeira eluição com tampão (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) (quantidade de proteína presente no total do volume eluído); (3) Segunda eluição com tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol (quantidade de proteína presente no total do volume eluído)..... | 68 |
| Figura 16. (A) SDS-PAGE da fração proteica total da membrana plasmática de <i>C. albicans</i> (100 µg) (B) Imunodeteção do polipéptido Blad na fração proteica total da membrana | |

plasmática de *C. albicans*. As setas indicam quais as bandas excisadas no gel (A) que possuem massa molecular idêntica às bandas nas quais o polipéptido Blad foi imunodetetado (B), para que a(s) proteína(s) presentes nessas bandas do gel pudessem ser posteriormente analisadas por espectrometria de massa.....72

Figura 17- Representação do modelo final da previsão da estrutura tridimensional do polipéptido Blad mostrando a extensão da sua cadeia proteica em cores de arco-íris (rainbow) na direção terminal N para terminal C. Representa-se também o sumário de confiança da modelação tridimensional do polipéptido Blad.....77

Figura 18. Indicação de que zona da sequência das proteínas homólogas ao polipéptido Blad, a sequência do polipéptido Blad foi coberta/correspondida. Indica também a % de confiança da modelação tridimensional do polipéptido Blad em relação a cada uma das 6 proteínas a este homólogas.....78

Figura 19. Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 1). O local de ligação previsto está representado a azul e os aminoácidos que o constituem estão representados a azul em formato ‘wireframe’. Os ligandos manose, β - manose e N-acetilglucosamina que fazem parte do ‘Cluster’ 1 estão representados a verde em formato ‘wireframe’.....80

Figura 20. Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 7). O local de ligação previsto está representado a azul e o aminoácido que o constitui está representado a azul em formato ‘wireframe’. O ião ligando magnésio que faz parte do ‘Cluster’ 7 está representado a verde em formato ‘spacefill’.....81

Figura 21. Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 9). O local de ligação previsto está representado a azul e o aminoácido que o constitui está representado a azul em formato ‘wireframe’. O ião ligando cálcio que faz parte do ‘Cluster’ 9 está representado a verde em formato ‘spacefill’.....82

Figura 22. Visualização em ‘Pymol’ da ancoragem/’docking’ efetuada no ‘software’ ClusPro2, entre a proteína enolase 1 de *C. albicans*, representada a cinzento, e o polipéptido Blad de *L. albus*, representado a azul. Indicam-se também na figura os terminais N- e C- da proteína e do polipéptido.....86

Figura 23. Visualização em ‘Pymol’ da ancoragem/’docking’ efetuada no ‘software’ ClusPro2, entre a proteína subunidade beta da ATP sintetase de *C. albicans*, representada a

cinzento, e o polipéptido Blad de *L. albus*, representado a azul. Indicam-se também na figura os terminais N- e C- da proteína e do polipéptido.....87

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Formação de esferoplastos de <i>C. albicans</i> . Variação da densidade óptica e da percentagem de formação de esferoplastos das células de <i>C. albicans</i> ao longo do tempo..... | 55 |
| Tabela 2. Detalhes dos ‘clusters’ de ligandos identificados no modelo estrutural tridimensional do polipéptido Blad..... | 79 |
| Tabela 3. Informação referente ao Cluster 1. | 80 |
| Tabela 4. Informação referente ao Cluster 2. | 81 |
| Tabela 5. Informação referente ao Cluster 3. | 82 |

Lista de Abreviaturas

BSA – Albumina de soro bovino
CE – Eletroforese capilar
DAPI – 4,6-diamidino-2-fenilindole
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DO – Densidade óptica
DRMs – Membranas resistentes a detergentes
DTT – Ditionitrito
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA – Ácido tetracético de etileno-glicol
ESI – Ionização por eletrospray
FID – Detetor de ionização de chama
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
GPI – Glicosilfosfatodilinositol
GYP – Glucose, extrato de levedura, peptona
HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
LC – Cromatografia líquida
MALDI – Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MS – Espectrometria de massa
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
Q-TOF – Quadrupolo-tempo de voo
RNA – Ácido ribonucleico
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TOF – Tempo de voo
YPD – Extrato de levedura, peptona, dextrose

I - INTRODUÇÃO

I.1. A Converde/CEV e o seu fungicida biológico

A Converde é uma empresa de biotecnologia criada recentemente, tendo a sua unidade industrial sido inaugurada em 2013 no Parque Tecnológico de Cantanhede. Na unidade industrial (Figura 1) é produzido um fungicida biológico de elevada eficácia destinado a ser comercializado em todo o mundo. Este fungicida tem como princípio ativo o polipéptido Blad, extraído a partir da espécie de tremço *Lupinus albus*. O polipéptido Blad foi originalmente descoberto no Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa em 1991 pelos investigadores Ricardo Ferreira, Vergílio Loureiro e Sara Monteiro. A investigação e desenvolvimento do fungicida biológico só se iniciou em 2007, com o financiamento no âmbito do programa COHiTEC, patrocinado pela COTEC, e apoio técnico da North Carolina State University, financiado pela FLAD.



Figura 1. Instalações da unidade industrial da empresa CEV/Converde [foto fornecida pela Converde].

A Converde tem disponível até ao momento um único produto para comercialização, o fungicida biológico ProBlad PLUS, que possui uma eficácia igual ou superior à dos melhores fungicidas de síntese química disponíveis no mercado.

Por enquanto o ProBlad PLUS ainda só foi autorizado para ser comercializado nos Estados Unidos e Canadá, estimando-se que as autorizações para se poder comercializar no resto do mercado mundial demorem ainda alguns anos.

A linha de produção (Figura 2A) do ProBlad PLUS começa na zona de germinação (Figura 2B), onde sementes secas da variedade de tremçoço *Lupinus albus* (Figura 2C) são colocadas em tabuleiros e submersas em água. A fase de germinação começa no escuro durante os primeiros quatro dias, ocorrendo várias irrigações durante este período. Ao quarto dia as sementes germinadas são expostas à luz durante 24 h, mantendo-se desta forma até ao oitavo dia, com uma temperatura constante de 18°C. Ao final do oitavo dia do crescimento da plântula de tremçoço, os seus cotilédones encontram-se no ponto ideal de desenvolvimento. Nesta altura, o polipéptido Blad atinge a sua concentração máxima nestes órgãos da plântula.



Figura 2. (A) Linha de produção industrial do ProBlad PLUS; (B) Zona de germinação do tremçoço (*Lupinus albus*); (C) Sementes de tremçoço (*Lupinus albus*) [fotos fornecidas pela Converde].

As plântulas e as cascas da semente são separadas por um crivo, sendo as cascas descartadas e seguindo as plântulas para um moinho onde ocorre a moagem das mesmas. À saída do moinho é adicionada uma solução aquosa de EDTA que é responsável por remover os cátions divalentes como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , promovendo a solubilização da proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad. A mistura é homogeneizada num tanque a uma temperatura de 8°C, onde ocorre a solubilização da proteína que incorpora o polipéptido Blad na fase líquida, sendo a mistura depois transferida para um decantador onde se dá a separação dos sólidos grosseiros da fase líquida. A fase líquida segue então para uma centrifugadora onde as partículas finas em suspensão são separadas do extrato aquoso, sendo que este contém solubilizada a proteína que incorpora o polipéptido Blad. Após centrifugação, o extrato aquoso passa através de um permutador de calor que faz a temperatura subir dos 8°C para os 60°C, sendo mantido num tanque a esta temperatura durante uma hora. Nestas condições ocorre a floculação/agregação da matéria orgânica que é termosensível. A maior parte das enzimas e proteínas são termosensíveis, promovendo-se portanto com este processo a sua desnaturação e agregação. De seguida ocorre uma nova centrifugação onde a matéria orgânica agregada é separada do extrato aquoso. O extrato aquoso segue depois para um evaporador de vácuo, diminuindo-se assim o seu teor de água. De seguida fica em repouso durante 12 h a 8°C. Devido ao aumento da concentração do extrato aquoso, existem materiais que ultrapassam o seu limite de solubilidade, ocorrendo a cristalização/precipitação de sais, de EDTA e de constituintes celulares que não se conseguiram remover em fases anteriores do processo. De seguida, os cristais formados após as 12 h de repouso são removidos do extrato aquoso através de uma centrifugação, seguindo-se a fase de formulação, onde são adicionados um anti-tensoativo e um dispersante, ambos de origem natural e biológica.

Com o objetivo de concentrar ainda mais a proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad, ocorre uma evaporação em vácuo dando origem ao produto final ProBlad PLUS. Este é um líquido viscoso de cor castanha que contém a proteína que incorpora o polipéptido Blad em 20% do seu peso húmido.

O ProBlad PLUS pode ser aplicado isoladamente ou misturado com outros pesticidas registados. Pode ser administrado com equipamento de pulverização vulgarmente usado no solo, aereamente ou com recurso a sistemas de aspersão/irrigação comumente utilizados. Não é necessário o uso de adjuvantes com ProBlad PLUS. Este pode ser aplicado até e durante o dia da colheita.

As doenças fúngicas alvo principais do ProBlad PLUS são o oídio, o míldio, a monílinia e a antracnose. As culturas alvo principais são o morango, a videira, o tomate, as árvores de frutos secos (noz, avelã e amêndoa, entre outras), as árvores de fruto (nectarina, pêsego, cereja, entre outras) e as plantas ornamentais.

Na Figura 3 é possível observar o potencial e eficácia do fungicida ProBlad PLUS num ensaio de campo feito com tomateiros atacados por *Botrytis* em que, do lado esquerdo da Figura 3, se pode visualizar uma cultura de tomate sem tratamento com ProBlad PLUS (controlo) e, do lado direito, pode visualizar-se uma cultura de tomate tratada com ProBlad PLUS.



Figura 3. Ensaio de campo realizado sobre a eficácia do fungicida biológico ProBlad Plus no combate à infeção por *Botrytis* em tomateiros. [foto fornecida pela Converde].

Apesar de atualmente a Converde possuir apenas um produto disponível para comercialização na área agrícola, esta empresa continua empenhada na investigação sobre o princípio ativo responsável pela atividade fungicida, o polipéptido Blad. Este possui elevado potencial para ser aplicado como fungicida nas áreas da saúde humana e alimentar.

Procura-se com este trabalho inferir acerca do mecanismo de ação do polipéptido Blad, que é responsável pela sua potente atividade fungicida, com o objetivo de obter conhecimentos que permitam a sua aplicação noutras áreas.

I.2. Via biossintética do polipéptido Blad e caracterização das suas propriedades

O polipéptido Blad (Figura 4A) é um produto intermediário estável do catabolismo da β -conglutina, sendo um polipéptido de 20 kDa, composto por 173 aminoácidos (Figura 4B), não glicosilado, fosforilado e faz parte de uma proteína de 210 kDa [1].

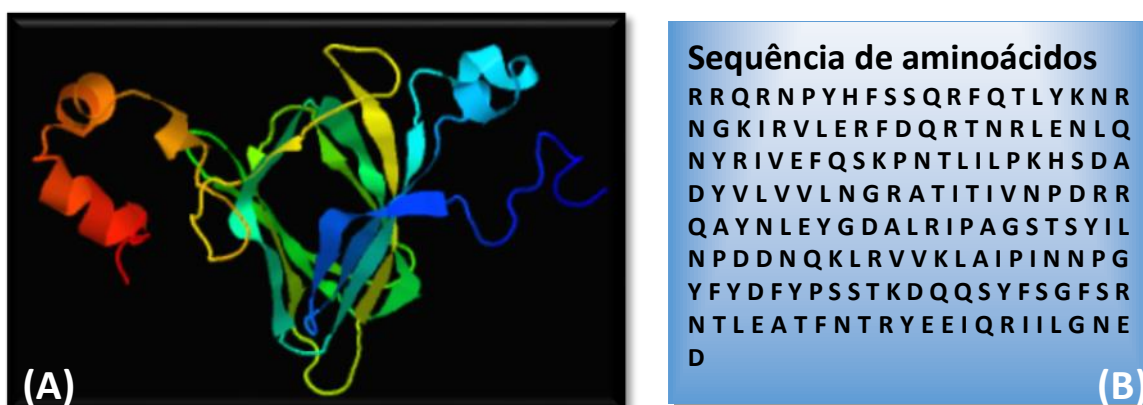


Figura 4. (A) Representação da estrutura tridimensional do polipéptido Blad baseada numa simulação [efetuada com a ferramenta bioinformática Phyre]; (B) Sequência de aminoácidos do polipéptido Blad [Uniprot].

A β -conglutina, uma vicilina ou também denominada por globulina 7S, é a maior proteína de reserva das sementes de espécies de *Lupinus*. As vicilinas têm sido consideradas importantes proteínas de reserva de sementes que não só desempenham um papel de reserva de nutrientes nas sementes em germinação, mas supondo-se também que desempenhem um segundo papel como proteínas relacionadas com a defesa da planta [2].

As subunidades da β -conglutina parecem ser sintetizadas nos cotilédones da plântula em desenvolvimento de *Lupinus albus*, a partir de um único polipéptido precursor glicosilado [3].

Os cotilédones em desenvolvimento nas sementes da planta de *L. albus*, 35 dias após o início da floração, contêm um polipéptido maioritário de 64 kDa que é o precursor da β -conglutina. A quantidade deste polipéptido diminui durante a maturação da semente, mas não desaparece completamente na semente madura. A proteína precursora de 190 kDa

da β -conglutina de consiste numa associação de três polipéptidos de 64 kDa que possuem hidratos de carbono ligados de forma covalente [3].

Durante o desenvolvimento cotiledonar na semente em formação e em direção à semente madura, a proteína precursora da β -conglutina sofre um ciclo de processamento intensivo, envolvendo processamento proteolítico e modificações na sua glicosilação. Consequentemente, o precursor dá origem a um conjunto complexo de formas processadas, devido a possuir um grande número de sítios de processamento, que são aparentemente estruturadas em trímeros com uma massa molecular de aproximadamente 187 kDa [4].

A análise por SDS-PAGE unidimensional da β -conglutina nos cotilédones da semente seca de *L. albus* revela que esta proteína é composta por 10 a 12 tipos principais de subunidades, com massas moleculares que variam desde 15 a 72 kDa, bem como um número considerável de constituintes minoritários [1].

Dado o grande número de subunidades diferentes disponíveis e a massa molecular de 180 a 200 kDa reportada para a β -conglutina, parece evidente que esta é caracterizada por uma micro-heterogeneidade bastante ampla que parece ser característica desta proteína. Diversos estudos obtiveram a mesma conclusão [3-8].

Durante a germinação das sementes e o consequente crescimento das plântulas, a β -conglutina é submetida a um ciclo de proteólise intensiva mas no entanto limitada. Entre os dias 3 e 5 após o início da germinação, a β -conglutina sofre uma grande mudança na sua estrutura e concentração, que envolve o aparecimento de um novo conjunto de polipéptidos, incluindo um grupo de massa molecular mais elevada, cuja concentração diminui até ao seu desaparecimento completo após 11 dias. Este processo envolve um grupo de proteínas de massa molecular mais baixa, cuja concentração aumenta no período de 5 a 11 dias após a germinação. Há uma acumulação abrupta de um polipéptido de 20 kDa (Blad) nos cotilédones de todas as espécies *Lupinus* já examinadas durante o 4º dia após a germinação, o qual é mantido em elevadas quantidades nesses órgãos, até que a sua quantidade diminui rapidamente após cerca de 12 a 14 dias [7, 9, 10].

A proteína nativa, resultante do processamento da β -conglutina, que contém o polipéptido Blad de 20 kDa, exibe uma aparente massa molecular de 210 kDa (quando estimada por filtração em gel), sendo composta por um polipéptido maioritário de 20 kDa (Blad), por pelo menos três polipéptidos de massa molecular menor e por vários polipéptidos de massa molecular maior, aquando da análise por SDS-PAGE unidimensional. Desta forma, nesta fase de proteólise limitada intensiva, várias

subunidades constituintes da β -conglutina são convertidas maioritariamente num produto intermediário estável do catabolismo da β -conglutina, o polipéptido Blad [1].

A purificação do polipéptido Blad e a sequenciação dos seus terminais -N e -C, bem como de várias sequências internas através de metodologias convencionais permitiram a identificação precisa da sequência nucleotídica que codifica o polipéptido Blad dentro da sequência nucleotídica do seu precursor inicial (precursor da β -conglutina). Esta sequência nucleotídica foi posteriormente confirmada por amplificação e sequenciação do produto obtido, utilizando ‘primers’ para ambas as extremidades do polipéptido Blad dentro da sequência nucleotídica do mRNA que codifica o precursor da β -conglutina. Uma análise detalhada da sequência nucleotídica correspondente ao fragmento do gene que codifica o polipéptido Blad, assim como da sequência de aminoácidos correspondente, revelou um número de características: (i) a presença de um intrão no fragmento do gene que codifica o polipéptido Blad; (ii) uma comparação da sequência do polipéptido Blad (depositada no GenBank sob o número de acesso DQ142920) com as de outras proteínas não revelou homologia significativa com qualquer outra sequência publicada; (iii) um número de sítios de fosforilação foram previstos na sequência do polipéptido Blad, consistente com a observação de que o polipéptido Blad é de facto fosforilado (dados em fase de publicação); (iv) um pI estimado de 9,6 e uma massa molecular de 20,404.85 Da; (v) a composição de aminoácidos do polipéptido Blad não é bem balanceada, principalmente devido à ausência de resíduos de triptofano, cisteína e metionina. A ausência de aminoácidos contendo enxofre está de acordo com o facto das proteínas de reserva de sementes de leguminosas serem pobres nestes aminoácidos [1]. Além disso, o precursor do polipéptido Blad, a β -conglutina, representa a maior deficiência em aminoácidos contendo enxofre nas proteínas de reserva de *Lupinus* [11,12]. No entanto, consistente com o seu papel de proteína de reserva, o polipéptido Blad contém uma proporção muito elevada de aminoácidos ricos em azoto, notoriamente arginina (18 resíduos em 173), asparagina (17 resíduos), glutamina (11 resíduos) e lisina (7 resíduos). Considerando o padrão preciso e característico da acumulação do polipéptido Blad durante o desenvolvimento de plântulas de *Lupinus*, a sua elevada abundância nos cotilédones (que compreende a maior parte do total de proteína cotiledonar nas plântulas com 8 dias de idade), a sua composição especial de aminoácidos e a sua associação com a β -conglutina, parece não haver dúvida de que o polipéptido Blad cumpre, tal como a β -conglutina, um importante papel de reserva na semente. De salientar que o padrão atípico de ocorrência do polipéptido Blad, exclusivamente durante um

período muito limitado de tempo no ciclo de vida das plantas de *Lupinus*, sugere que esta proteína pode exibir outras funções fisiológicas [1].

O polipéptido Blad liga-se fortemente à quitina e interage com anticorpos anti-ubiquitina de coelho, com uma variedade de glicoproteínas, incluindo imunoglobulinas G de várias espécies animais, com a peroxidase de rábano e com a fosfatase alcalina, sugerindo que possui atividade do tipo lectina. A sua atividade é resistente a tratamentos com dodecil sulfato de sódio ou metanol, fervura e autoclavagem [10].

A proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad auto-agrega-se num processo dependente dos cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} . Este fenómeno de auto-agregação desta proteína causa turbidez em solução. A glucose, galactose, manose, fucose, rafinose, *N*-acetilglucosamina e *N*-acetilgalactosamina não afetaram o estado de agregação da proteína. No entanto, outros carboidratos (ácido glucurónico, glucosamina, galactosamina, ácido galacturónico e ácido siálico), aminoácidos (glicina, lisina, arginina, histidina e ácido glutâmico) e ácido fítico interferem com o processo de agregação. Particularmente fortes são os efeitos do ácido siálico e do ácido fítico, produzindo efeito inibitório no processo de auto-agregação da proteína de 210 kDa dependente dos cátions divalentes Mg^{2+} e Ca^{2+} , mesmo a concentrações muito baixas [13].

Além da aplicabilidade na saúde humana como fungicida para combater doenças infecciosas provocadas por fungos patogénicos, o polipéptido Blad tem também potencial para ser utilizado na indústria de alimentar, na agricultura ao ar livre, na agricultura biológica e em estufas.

O polipéptido Blad já foi testado pelos investigadores da Converde contra uma vasta gama de fungos e a sua atividade antifúngica parece ser universal [resultados não publicados]. Além disso, os ensaios de toxicidade aguda preliminares não detetaram nem toxicidade oral (em ratos) nem toxicidade cutânea/alérgica (em porquinhos da índia).

Ao considerar as aplicações na área da agricultura, o polipéptido Blad exibe atividades antifúngicas preventivas e curativas, possuindo atividade contra uma ampla gama de fungos patogénicos, sendo improvável o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte destes.

I.3. Visão geral sobre os fungicidas

Apesar da contínua descoberta de compostos que são capazes de controlar eficazmente o crescimento de fungos patogénicos, uma das principais preocupações sobre as infeções fúngicas deriva da similaridade entre o metabolismo celular de fungos, humanos e plantas. Esta é a principal razão por detrás do elevado nível de toxicidade geral associada aos fungicidas disponíveis no mercado, e também pela falta de fármacos apropriados para combater fungos patogénicos em humanos sem efeitos secundários prejudiciais [14].

Os maiores fabricantes de produtos fitofarmacêuticos são empresas essencialmente de síntese química. Com a crescente preocupação pública sobre a aplicação generalizada de fungicidas de síntese química e o contínuo aperto da legislação, baseada essencialmente numa redução do nível de toxicidade dos fungicidas comerciais que são autorizados a entrar no mercado, as estimativas atuais indicam que 100.000 novos compostos de síntese química são testados por cada novo fungicida lançado, o que aumenta os custos de desenvolvimento de novos fungicidas para níveis insustentáveis. Infelizmente, no contexto atual, os fungicidas biológicos de baixa toxicidade existentes atualmente no mercado exibem taxas de eficácia bem abaixo dos seus homólogos de síntese química. A capacidade adicional de fungos patogénicos para desenvolverem mecanismos de resistência contra alguns fungicidas de síntese química de topo, tem levado algumas empresas de destaque no campo a abandonar o desenvolvimento de extremamente alto custo de novos fungicidas de síntese química eficazes. [14].

O contínuo aumento da população humana e a preocupação pública com o uso generalizado de fungicidas de síntese química, associado ao aumento do número de fungicidas obsoletos que derivam a partir do desenvolvimento de resistência fúngica, exigem formas alternativas de controlo das doenças. É portanto necessário o desenvolvimento de novos fungicidas eficazes, com pouca ou nenhuma toxicidade para os humanos e ambientalmente sustentáveis, abrindo-se assim a porta para o controlo biológico dos fungos [14].

O fungicida biológico ProBlad PLUS representa um produto único no mercado dos fungicidas agrícolas por ser tão ou mais eficaz que os seus homólogos de síntese química e por não apresentar toxicidade para os humanos, animais superiores, insetos e plantas. O

polipéptido Blad possui também elevado potencial de aplicabilidade na área da saúde humana, podendo atuar como antifúngico no combate a doenças infecciosas provocadas por fungos patogênicos.

A infecção fúngica mais comum em humanos é provocada por *Candida albicans* [15], sendo a infecção fúngica causada por *Aspergillus fumigatus* também relativamente comum [16]. A ocorrência de infecções fúngicas por parte dos gêneros *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, non-*neoformans* *Cryptococcus* e *Geotrichum* tem também aumentado nos últimos anos [15]. Em relação aos antifúngicos atuais para tratar infecções fúngicas em humanos destacam-se três classes de antifúngicos, os polienos, os azóis e as echinocandinas, e ainda o antifúngico flucitosina que não se enquadra em nenhuma destas classes [17].

Os polienos são uma classe de antifúngicos com largo espectro de ação, sendo que a anfotericina B foi durante muitos anos o único polieno antifúngico que pôde ser administrado sistematicamente para tratar infecções fúngicas viscerais. O seu modo de ação é atípico para uma molécula antimicrobiana, pois em vez de por exemplo causar a inibição de uma enzima, liga-se ao ergosterol, o principal esteroide em membranas plasmáticas fúngicas, perturbando a sua função ao ponto de provocar o vazamento dos componentes intracelulares. A anfotericina B tem maior afinidade de ligação para o ergosterol do que para o colesterol [18]. No entanto, a diferença de afinidade de ligação a estes esteróides não é assim tão grande, sendo esta característica responsável pela sua toxicidade em células de mamíferos. Apesar dos problemas em relação à sua toxicidade, esta molécula retém a sua popularidade clínica [19].

A maior classe de antifúngicos de uso clínico são os azóis, sendo dividida em dois grupos, os imidazóis e os triazóis. O seu principal efeito é inibir a 14 α -desmetilação do lanosterol na via biossintética do ergosterol [20], mas em algumas espécies de fungos inibe também o subsequente passo da Δ 22-dessaturase [21]. Consequentemente a depleção de ergosterol e a sua reposição por esteróides não usuais na membrana plasmática do fungo causa alterações na sua fluidez e permeabilidade, provocando consequências secundárias para as enzimas a esta associadas, tais como as que estão envolvidas na síntese da parede celular [22].

Outra classe de antifúngicos com uso clínico são as echinocandinas. O seu alvo é o complexo de proteínas responsável pela síntese do polissacarídeo β -1,3-glucana da parede

celular [19]. Os antifúngicos mais conhecidos desta classe são a caspofungina, micafungina e anidulafungina [23].

Todas estas três classes principais de antifúngicos para tratar infecções fúngicas em humanos apresentam considerável toxicidade para o Homem [19,22,23].

A flucitosina é outro antifúngico comumente utilizado que não se inclui em nenhuma das outras três classes de antifúngicos definidas anteriormente. Este possui uma especificidade única por células fúngicas, e não por células humanas, pois os fungos possuem uma enzima adicional que tem a capacidade para absorver a flucitosina e convertê-la internamente em 5-fluorouracil, um composto que é tóxico para todas as células eucarióticas. O 5-fluorouracil incorpora-se no DNA e RNA da célula fúngica, bloqueando a síntese destas duas moléculas vitais e prevenindo deste modo a proliferação celular do fungo [24].

Devido à morbidez e mortalidade relacionada com as infecções fúngicas em humanos, o seu tratamento com uma combinação de diferentes antifúngicos é por vezes considerado. Isto permite aumentar o espectro de ação, aumentar a taxa de morte dos fungos patogénicos, minimizar o desenvolvimento de resistência e reduzir toxicidades por parte destes [23].

A pesquisa por novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos, por outros alvos celulares e por novos mecanismos de ação, é necessária para que se consiga lidar com o crescente número de infecções fúngicas provocadas por diversos fungos patogénicos. Neste contexto, o polipéptido Blad possui um enorme potencial para ser aplicado no combate às infecções fúngicas em humanos, pois não apresenta toxicidade para os humanos e a sua ação antifúngica parece ser universal.

I.4. Membrana plasmática de fungos unicelulares (leveduras)

A camada mais externa do envelope das células de fungos unicelulares é a parede celular. A parede celular mantém a estrutura e a rigidez da célula, mas no entanto é livremente permeável a solutos. Por baixo da parede celular, a membrana plasmática forma uma barreira relativamente impermeável a moléculas hidrofílicas e é um componente celular de enorme interesse, de um ponto de vista terapêutico e de diagnóstico. A

membrana plasmática dos fungos unicelulares é uma estrutura essencial na interface entre as células e o meio exterior. De modo a possibilitar estas funções, a bicamada fosfolipídica da membrana plasmática contém proteínas de transporte, proteínas recetoras e proteínas de sinalização, que medeiam uma variedade de funções, tais como a sinalização e a comunicação com o ambiente externo, a captação e/ou secreção seletiva de solutos através da membrana, endocitose/exocitose, a geração do potencial de membrana, e a síntese e manutenção da parede celular [25].

Dependendo da sua estrutura e do modo de associação com a membrana, existem dois tipos de proteínas membranares: proteínas de membrana integrais e periféricas. As proteínas integrais, também denominadas por proteínas transmembranares, atravessam a membrana com um ou mais domínios transmembranares, na maioria das vezes por hélices α hidrofóbicas ou menos frequentemente por domínios em barril β , que interagem fortemente com a membrana.

As proteínas de membrana periféricas não atravessam a membrana, mas interagem com esta. Estas proteínas estão geralmente ligadas indiretamente à membrana, através de interações com as proteínas de membrana integrais, ou podem estar ligadas diretamente. Estas podem interagir diretamente com os fosfolípidos através de domínios de ancoragem. Estes domínios de ancoragem podem possuir diferentes estruturas: domínios de hidrocarbonetos (tais como grupos prenilo, farnesilo e geranilgeranilo), grupos acilo de ácidos gordos (por exemplo, miristato ou palmitato), ou uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) [26]. As proteínas ancoradas a GPI são de particular interesse, pois incluem enzimas associadas à membrana, moléculas de adesão, antigénios de ativação e marcadores de diferenciação. Em fungos, as proteínas ancoradas a GPI estão localizadas na membrana plasmática e na parede celular, atingindo o seu destino final através da via secretora. Estas estão envolvidas numa variedade de funções, tais como a filamentação, a reprodução, floculação, ou a adesão à matriz externa, o que requer a sua localização na superfície da célula [27].

A membrana plasmática dos fungos é o maior alvo para as proteínas antifúngicas. As estruturas alvo das proteínas antifúngicas são a parede celular, a membrana plasmática e vários alvos intracelulares [28]. Foram descritas mais de 500 proteínas que ocorrem naturalmente e nas quais se acredita que interagem com a membrana plasmática de fungos, levando à formação de poros, ao efluxo de componentes celulares e a alterações no potencial de membrana. Estas proteínas exibem uma enorme diversidade de estruturas, mas

partilham pelo menos duas características em comum: uma carga líquida positiva em condições fisiológicas, que promove a interação com superfícies microbianas carregadas negativamente; uma estrutura anfipática, isto é, uma estrutura com duas faces sendo uma carregada positivamente e a outra neutra ou hidrofóbica, permitindo assim a incorporação em membranas plasmáticas de fungos patogénicos [29].

Uma diferença significativa entre as membranas plasmáticas de eucariotas superiores e de fungos unicelulares são os principais esteróis nestas embebidos: o colesterol (zoosterol), o campesterol, o sitosterol, o estigmasterol (fitoesteróis) ou o ergosterol (micosterol). O ergosterol na membrana fúngica compreende aproximadamente 2 % do peso seco do fungo [30,31], sendo o componente maioritário da membrana plasmática e que desempenha importantes funções no funcionamento da célula fúngica [32,33]. O ergosterol ajuda a manter a fluidez e integridade da membrana, assegurando também a correta função de várias enzimas a esta associadas [34]. Muitas classes de fármacos antifúngicos têm como alvo enzimas específicas da via de biossíntese do ergosterol [35-38].

Todas as células, desde as dos seres humanos às bactérias, assim como os vírus, possuem inúmeros hidratos de carbono na superfície exterior das suas células. Estes hidratos de carbono encontram-se tanto na parede celular como na membrana plasmática. As células fúngicas são rodeadas por uma parede celular, tipicamente composta por polissacarídeos, tais como a quitina e β -glucanas. Imediatamente abaixo, a membrana plasmática protege o citoplasma do meio extracelular. Esta contém um elevado número de glicoproteínas e glicolípidos, cujos domínios de hidratos de carbono são projetados para o exterior da célula [14].

I.5. *Candida albicans* e a sua membrana plasmática

A *Candida albicans* foi o fungo patogénico modelo utilizado neste trabalho, cujo objetivo principal foi identificar e compreender o mecanismo de ação antifúngica por parte do polipéptido Blad. Esta escolha teve em conta o potencial da aplicabilidade do polipéptido Blad na saúde humana, em que pode atuar como fungicida para combater doenças infecciosas provocadas em humanos por fungos patogénicos. A identificação e

compreensão do mecanismo de ação antifúngica do polipéptido Blad são requisitos absolutamente necessários para a sua futura aplicação como antifúngico na área da saúde humana, já que nesta área os testes, normas e legislações são mais controladas e apertadas. Desconfia-se que o desenvolvimento de mecanismos de resistência por parte dos fungos ao polipéptido Blad seja improvável.

A *Candida albicans* é um fungo patogénico dimórfico oportunista que causa uma grande variedade de infeções, indo desde infeção relativamente focada, como a micose superficial, até à infeção por candidíase sistémica em indivíduos com sistemas imunitários enfraquecidos. [39,40] *C. albicans* é reconhecida atualmente como a causa de infeção fúngica mais comum, sendo responsável por uma elevada taxa de mortalidade [41,42]. Várias espécies de *Candida spp.*, em particular *C. albicans*, habitam normalmente na cavidade oral, nos tratos respiratório e digestivo, na corrente sanguínea e na cavidade intestinal de humanos e animais. A colonização de *C. albicans* pode conduzir a infeção sistémica quando o hospedeiro apresenta fatores de risco/predisposição [43]. Os fatores de predisposição a infeção por *C. albicans* incluem terapias imunossupressoras e citotóxicas, tratamento com um amplo espectro de antibióticos, SIDA, diabetes, abuso de narcóticos, uso de cateteres, etc [44]. O desenvolvimento da candidíase depende de um balanço delicado entre o fungo e o estado do sistema imunitário do hospedeiro, o que determina uma relação comensal ou parasítica [43]. A disponibilidade limitada de arsenais terapêuticos faz o estudo da sua fisiologia crítico de modo a se descobrirem novos alvos para ação antifúngica e consequentemente novos antifúngicos [45,46]. Neste sentido, a parede celular e a membrana plasmática de *C. albicans* parecem ser estruturas promissoras na pesquisa por proteínas envolvidas na biogénese da parede celular, interação patogénico-hospedeiro e sinalização celular. O estudo destas proteínas poderá proporcionar a descoberta de novos alvos para ação de antifúngicos, de marcadores de prognóstico e de vacinas candidatas [47].

A distribuição de esfingolípidos, fosfolípidos e ergosterol na membrana plasmática de *C. albicans* é assimétrica [46]. A maioria dos esfingolípidos, se não mesmo todos, estão presentes na camada exterior, enquanto os fosfolípidos estão restritos à camada interior [48]. A membrana plasmática de *C. albicans* não é homogénea em relação à sua composição lipídica. Existem algumas regiões da membrana que contêm maior concentração de ergosterol e esfingolípidos [49,50]. Estas regiões encontram-se mais organizadas que outras regiões da membrana devido à maior quantidade de cadeias de

ácidos gordos saturadas, sendo denominadas por ‘lipid rafts’. As ‘lipid rafts’ são portanto estruturas altamente empacotadas, o que as torna insolúveis a detergentes não iônicos como o Triton X-100 a temperatura baixa [51], sendo por esta razão também chamadas de membranas resistentes a detergentes (DRMs). Além da presença em *C. albicans* [47,52] as ‘lipid rafts’ foram também identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* [53,55] e *Schizosaccharomyces pombe* [56], e em todas estas leveduras parecem estar envolvidas em vários importantes processos biológicos tais como, reprodução [55], citocinese e formação de hifas [54]. As composições das ‘lipid rafts’ são heterogêneas incluindo proteínas transmembranares e proteínas ancoradas a GPI [48].

Existem dois estudos até à data que utilizaram abordagens proteômicas para identificar proteínas de membranas resistentes a detergentes (DRMs) da membrana plasmática de *C. albicans*. Num estudo realizado por Insenser et al. [57] foi efetuada uma análise proteômica acerca da composição em proteínas das DRMs. Os investigadores separaram por SDS-PAGE uma fração enriquecida com este tipo de proteínas e conseguiram identificar 29 proteínas, algumas das quais já descritas como típicas das ‘lipid rafts’ de outros organismos, e quatro das quais descritas como proteínas da membrana plasmática. Noutro estudo efetuado por Alvarez e Konopoka [58], estando estes interessados em estudar novas proteínas que pudessem estar relacionadas com a regulação da morfogénese e da virulência nas DRMs de *C. albicans*, mais de 100 proteínas foram identificadas nas suas amostras.

Um outro estudo, sobre o proteoma da membrana plasmática de *C. albicans*, mantém-se até à presente data como aquele que identificou o maior número de proteínas membranares, incluindo proteínas ancoradas a GPI. De forma a descrever o proteoma da membrana plasmática de *C. albicans*, que inclui também proteínas membranares ancoradas a GPI, foram testadas diferentes abordagens para a extração e posterior identificação das proteínas membranares. Estas foram baseadas em (i) produção de protoplastos; (ii) diferentes métodos de disrupção mecânica; (iii) ultracentrifugação com diferentes gradientes de sacarose; (iv) enriquecimento das proteínas da membrana plasmática com tratamentos de Na₂CO₃ para libertação das proteínas membranares ancoradas a GPI. Foram identificadas 41 proteínas previamente descritas como proteínas da membrana plasmática, 20 proteínas associadas à membrana plasmática e 22 proteínas com localização desconhecida na membrana plasmática. A sua análise bioinformática revelou que este conjunto de proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* é rico em proteínas que

estão envolvidas na síntese de biopolímeros ou processos de transporte. Foram também identificadas 12 proteínas da membrana plasmática ancoradas a GPI, tendo-se verificado que a maior parte destas estão associadas à síntese de β -glucana da parede celular e à manutenção de fatores de virulência, tais como fosfolipases e aspartil proteinases [59].

I.6. Exoglicoma e sua importância nas células

Em analogia com o termo glicoma, o termo exoglicoma foi proposto para representar as cadeias de oligossacarídeos presentes na superfície exterior da membrana plasmática, excluindo portanto os hidratos de carbono da parede celular, sempre que presentes, que tendem a ter um papel passivo ou “não tão ativo” na mediação da comunicação da célula com o ambiente exterior. [60-62]. O exoglicoma pode portanto ser definido como a coleção de domínios de hidratos de carbono presentes em glicoproteínas *N*-ligadas, glicoproteínas *O*-ligadas e glicolípidos, que se projetam para o exterior da membrana plasmática [14].

As glicanas que modificam um sítio individual são tipicamente expressas como uma mistura de glicoformas com uma estrutura ‘central’. Esta diversidade multiplica a complexidade estrutural e funcional de proteínas e lípidos em ordens de magnitude [63]. As estruturas glicosídicas finais são específicas do tipo celular e dependem de múltiplos fatores, incluindo disponibilidade de enzimas, de açúcares ligados a nucleótidos e também da cinética de transporte de glicoconjugados. Como resultado, as glicanas glicoconjugadas são misturas de variantes (glicoformas) com uma estrutura central. Isto serve para diversificar as funções biológicas do número limitado de genes nos genomas de animais superiores de forma a criar estruturas de tecido com limites definidos e funções controladas [62].

O exoglicoma tem elevada importância ao nível das interações de cada célula com o seu ambiente envolvente, incluindo outros organismos, órgãos, tecidos, células e moléculas [14]. As glicanas do exoglicoma são expressas num tipo específico de célula e são reguladas numa maneira temporal, de forma a permitir que as células mudem dinamicamente de fenótipos em resposta a estímulos ambientais [62]. Por exemplo, as estruturas de glicanas na superfície das células variam de acordo com a localização

espacial no tecido e com fatores temporais. Assim, as células respondem a estímulos ambientais alterando as estruturas das glicanas nas suas superfícies. As glicanas são sintetizadas numa forma que não é controlada por um molde, como ocorre no caso do DNA e das proteínas, e as suas estruturas finais surgem pela expressão coordenada de um grande número de genes que codificam glicosiltransferases, glicosidases, e outras enzimas que sintetizam e remodelam as cadeias de glicanas, assim como enzimas acessórias envolvidas na síntese e transporte de moléculas nucleótido-açúcar. As suas estruturas são portanto reguladas dinamicamente [60,61].

As funções relativamente pouco específicas propostas para os oligossacarídeos que compõem o exoglicoma são: proteger o eixo peptídico nas glicoproteínas da ação das proteases, melhorar a solubilidade das glicoproteínas e corrigir o posicionamento da glicoproteína. As suas funções altamente especializadas são: a regulação de interações célula-célula (discriminação entre própria e não própria), a regulação de interações célula-matriz, a regulação de interações célula-molécula (interações lectina-oligossacarídeos), o controlo de qualidade de proteínas críticas para o desenvolvimento e funcionamento de organismos multicelulares complexos e servem ainda como recetores para vírus, bactérias e fungos [14].

Na verdade, o princípio básico de glicosilação, ou seja, a falta de um molde, faz o exoglicoma inerentemente sensível a todas as mudanças dentro da célula (e, possivelmente, do lado de fora também), sendo que as estruturas das glicanas que estão a ser produzidas em qualquer momento espelham todos os eventos relevantes passados na célula [60]. A glicosilação representa uma das mais frequentes modificações que ocorrem na pós-tradução de proteínas. Estima-se que cerca de 0,5-1 % dos genes humanos codificam proteínas relacionadas com a biossíntese, função e degradação das cadeias de açúcar [14].

Os fatores subjacentes à capacidade de codificação do código dos açúcares resultam numa complexidade estrutural muito maior dos oligossacarídeos em relação a ácidos nucleicos e proteínas, resultando assim na elevada dificuldade da sua análise e/ou síntese. A grande complexidade da análise de hidratos de carbono deve-se a um número de fatores que são essencialmente responsáveis pela sua imensa diversidade estrutural. Esses fatores são: a sequência de monossacarídeos, originada pela variedade de blocos de construção de monómeros; a existência de estruturas poliméricas lineares ou ramificadas, e, no último caso, os seus padrões de ramificação; as diferentes formas moleculares que os monossacarídeos podem adotar, tais como diferentes tamanhos do anel (furanose ou

piranose) e ainda as suas conformações; a diversidade isomérica, incluindo as duas possíveis ligações estereoquímicas entre monómeros, ou seja, a configuração α ou β assumida pelo carbono anomérico; o ponto de ligação, ou seja, o átomo de carbono anomérico de um monossacarídeo pode estar ligado a qualquer átomo de carbono contendo um grupo hidroxilo do monossacarídeo adjacente; a diversidade de modificações secundárias de monómeros (por exemplo, a metilação, sulfatação, acetilação e fosforilação); os diferentes modos de ancoragem de glicanas na superfície celular (incluindo glicolípidos e glicoproteínas); a relação indireta com o genoma; a variedade de contextos moleculares em que as modificações são encontradas [14].

Com base nas interações altamente específicas entre as glicanas e os seus recetores fisiológicos (lectinas), o exoglicoma está intimamente envolvido em muitos eventos biológicos fundamentais, incluindo a diferenciação de células, desenvolvimento, sinalização celular, adesão celular, reconhecimento de células, metástase, patogénese microbiana e reconhecimento imunológico [60,64,65], podendo ainda fornecer importantes marcadores biológicos para uma ampla variedade de doenças [66].

As áreas de pesquisa do exoglicoma e da membrana plasmática têm sido negligenciadas no caso de fungos patogénicos para humanos e plantas, particularmente se levarmos em conta a ausência de tratamentos altamente eficientes e as altas taxas de mortalidade observadas em grupos humanos específicos [14].

I.7. Os recetores de oligossacarídeos - Lectinas

De modo a codificar a complexa capacidade do reconhecimento biomolecular estabelecida entre hidratos de carbono e proteínas, a natureza tem à sua disposição uma poderosa ferramenta de informação, o código do açúcar. O papel de leitura das mensagens codificadas por açúcares é realizado principalmente por uma classe específica de proteínas que se ligam a hidratos de carbono ou recetores. Na verdade, o papel atribuído aos oligossacarídeos como o terceiro código da vida implica a existência dos recetores correspondentes. Tais recetores, denominados por lectinas, podem ser definidos como proteínas de origem não-imune (excluindo portanto as imunoglobulinas) que se ligam de uma forma estável (excluindo assim as enzimas, proteínas sensoriais e proteínas de

transporte de hidratos de carbono) a hidratos de carbono. As lectinas são proteínas com uma distribuição ubíqua na natureza, sendo as plantas a mais rica fonte de lectinas, nomeadamente em sementes de leguminosas e usualmente em órgãos de armazenamento das plantas em geral [66]. Acredita-se que muitas lectinas evoluíram com o objetivo de reconhecer e de se ligarem a oligossacarídeos com estruturas específicas. No entanto, estas apresentam também uma enorme diversidade de especificidade para açúcares, exibindo geralmente uma maior afinidade de ligação com oligossacarídeos e glicoproteínas do que com açúcares simples, possuindo ainda a capacidade de precipitar glicoproteínas e oligossacarídeos multivalentemente ramificados [67,68].

As funções biológicas das lectinas são muitas e foram revistas recentemente. Alguns autores consideram as lectinas de sementes como proteínas de reserva com uma função passiva, pois parecem não possuir nenhuma função além da de reserva, especialmente no que diz respeito à sua função/atividade de lectina. A presença de grandes quantidades de lectinas em sementes de leguminosas que parecem cumprir um papel de armazenamento continua a ter causas desconhecidas. Contrariamente, outros autores consideram as lectinas como proteínas biologicamente ativas, pois desempenham não só um papel de reserva de carbono orgânico, azoto e enxofre, como também podem desempenhar um papel na defesa da planta, pois ao serem um fator de reconhecimento específico podem interagir com glicoconjugados de outros organismos [66,68,69].

Em virtude da sua especificidade de ligação, as lectinas têm sido usadas como fiáveis sondas bioquímicas, citoquímicas e histoquímicas no estudo de subtis diferenças nos glicoconjugados da superfície celular, que de outra forma são indetetáveis com os anticorpos monoclonais disponíveis [70]. Uma vez que a maioria das lectinas interage especificamente com o terminal não-redutor dos resíduos de açúcar em glicoproteínas e glicolípidos presentes na membrana plasmática, estas podem ser usadas para caracterizar esses glicoconjugados de superfície com base nos monossacarídeos que inibem o processo de ligação [14].

I.8. Definição de *N*- e *O*- glicanas de glicoproteínas

As classes mais comuns de glicoproteínas encontradas em células eucarióticas são definidas essencialmente de acordo com a natureza da região glicosídica (core) de ligação com a proteína: *N* - e *O*- glicoproteínas.

Uma *N*-glicana (oligossacarídeo *N*-ligado, oligossacarídeo *N*-(Asn)-ligado) é um oligossacarídeo ligado covalentemente a um resíduo de asparagina numa cadeia polipeptídica [71], como parte de uma sequência de consenso de três aminoácidos NXS/T, em que X é qualquer aminoácido exceto prolina e o terceiro aminoácido pode ser serina ou treonina [66]. *N*-glicanas partilham uma região ‘central’ comum, que é um pentassacarídeo, e podem ser geralmente divididos em três classes principais: - do tipo elevada quantidade de manose, do tipo complexo, e do tipo híbrido [71].

Uma *O*-glicana (oligossacarídeo *O*-ligado, oligossacarídeo *O*-(Ser/Thr)-ligado) é tipicamente ligada ao polipéptido por meio de *N* - acetilgalactosamina (GalNAc) a um resíduo de serina ou treonina, e pode ser estendido com uma variedade de diferentes classes principais estruturais [71]. Não há nenhuma sequência de consenso para *O*-glicanas, mas são geralmente encontradas em regiões de proteínas ricas em serina e treonina. As *O*-glicanas ligados são geralmente menores (em comparação com *N*-glicanas) e costumam consistir entre de 3 a 10 monossacarídeos [66].

Outras classes de oligossacarídeos também podem ser encontradas em células eucarióticas, tais como glicofosfolípidos, mucinas (grande glicoproteína que possui muitas *O*-glicanas), glicolípidos e gangliósidos (glicolípidos aniônicos contendo um ou mais resíduos de ácido siálico) [71].

I.9. Desglicosilação de *N*- e *O*-glicanas

A maioria dos métodos para análise da glicosilação de proteínas conta com a libertação das glicanas a partir da glicoproteína [72-74]. Os métodos para a libertação, recuperação e análise de *N*-glicanas estão bem estabelecidos, sendo o método mais comum usado atualmente a libertação enzimática utilizando as enzimas *N*-glicosidase F (PNGase F) ou *N*-glicosidase A (PNGase A) [75]. No entanto, a libertação e recuperação de *O*-

glicanas, particularmente de *O*-glicanas intactas, continua a ser um processo de difícil execução. Um importante fator responsável por este facto é que a libertação enzimática do *O*-glicanas é limitada à ação enzimática da endo- α -*N*-acetilgalactosamidase, uma *O*-glicanase com elevada especificidade que apenas permite a remoção do dissacarídeo (Gal β 1-3GalNAc) ligado a serina ou treonina [76]. Portanto, os melhores métodos atuais para a remoção universal de *O*-glicanas de glicoproteínas envolvem a libertação química. Ao longo dos últimos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos para a libertação química das *O*-glicanas, incluindo técnicas que usam a eliminação β redutora ou não redutora [77].

I.10. Espectrometria de massa de glicanas

De um modo geral, existem três maneiras principais para analisar glicosilação em proteínas: análise e caracterização de glicanas em glicoproteínas intactas; análise e caracterização de glicanas ligadas covalentemente a glicopéptidos, ou análise estrutural das glicanas libertadas [77]. As glicoproteínas intactas, glicanas libertadas ou glicopéptidos podem ser analisados utilizando uma variedade de plataformas analíticas, tais como HPLC, cromatografia de afinidade com lectina, espectrometria de massa, eletroforese capilar [63,75,78]. Dependendo do método utilizado, têm também de ocorrer outros passos necessários para obter amostras adequadas para análise [77].

Os desafios da glicobiologia analítica são mais complexos do que aqueles encontrados em genómica e proteómica pois a elucidação estrutural completa de glicanas requer a determinação da sequência de açúcares, ramificações dos açúcares, composição dos monossacarídeos, ligações interglicosídicas e configuração anomérica. É muitas vezes necessário o uso de uma ampla gama de diferentes metodologias analíticas para se alcançarem caracterizações estruturais completas. A micro-heterogeneidade, o local relativo de ocupação e a complexidade da estrutura de glicanas são responsáveis pela relativamente baixa sensibilidade global da análise de glicanas. As glicoproteínas existem tipicamente como uma população diversa de glicoformas transportando entre um e várias dezenas de diferentes glicanas com quantidades molares variáveis em locais de glicosilação e diferentes graus de ocupação. São necessárias várias etapas para uma

caracterização estrutural completa do padrão de glicosilação de glicoproteínas sendo que a espectrometria de massa pode fornecer respostas na maioria dos casos. Estas etapas podem ser resumidas da seguinte forma: 1) determinação de quais os locais que são glicosilados na glicoproteína, 2) determinação da extensão da ocupação em cada local, 3) determinação das estruturas e da quantidade de cada glicana em cada local, e 4) determinação do número total de espécies moleculares individuais [79].

Nos últimos anos têm ocorrido importantes desenvolvimentos na análise de padrões de glicosilação. A espectrometria de massa, em combinação com metodologias de separação modernas, tornou-se uma das técnicas mais poderosas e versátil para a análise estrutural de glicanas. A espectrometria de massa oferece muitas vantagens em relação aos métodos analíticos tradicionais, tais como, baixo consumo de amostra e elevada sensibilidade [79].

As técnicas de separação de glicanas libertadas de glicoproteínas com maior relevância são a cromatografia líquida (HPLC) e eletroforese capilar (CE). As glicanas libertadas, derivatizadas ou não, são os analitos preferidos no caso de se pretender a separação de isômeros estruturais, pois, por exemplo, na separação de glicopéptidos a porção do péptido domina o comportamento cromatográfico. A importância da separação dos analitos, seja cromatográfica ou eletroforética, anterior à sua análise por espectrometria de massa está cada vez mais a ser reconhecida em química analítica, sendo também uma realidade na análise de glicanas [80].

Enquanto vários métodos de ionização foram desenvolvidos para introduzir biomoléculas como analitos intactos na fase gasosa, os dois que são usados quase exclusivamente para a análise de glicanas são o MALDI e o ESI, sendo o MALDI indiscutivelmente o mais popular. O MALDI é geralmente considerado o método de ionização mais sensível, particularmente para glicanas não derivatizadas, sendo que uma das chaves para uma análise bem-sucedida com MALDI é a seleção de uma matriz apropriada. O ácido 2,5-di-hidroxibenzóico tem sido amplamente utilizado como matriz por uma série de anos no entanto, surgem agora, novas matrizes com propriedades muito atraentes, em termos de uma geral melhoria da força do sinal iónico [81].

A capacidade que os métodos de ionização de MALDI e ESI têm em fornecer informações estruturais a diferentes níveis depende do tipo de analisador de massa acoplado. As características relevantes de um analisador de massa são a sensibilidade,

precisão em massa, resolução, velocidade de aquisição de dados e a possibilidade de realização de uma ou até mesmo várias etapas de MS/MS [80].

Para ESI, os ‘ion-traps’ que possuem capacidade de análise por MSⁿ, embora com resolução limitada, podem ainda ser vistos como úteis, mas analisadores Q-TOF e ‘Orbitrap’, com uma resolução muito mais elevada, são preferíveis se disponíveis. A fragmentação induzida por colisão (CID-collision-induced fragmentation) continua a ser a opção com maior relevância para a fragmentação de glicanas. Os resultados obtidos com CID dependem fortemente do tipo de analisador utilizado, em particular da energia de colisão aplicada ao analito e da escala de tempo do processo de dissociação, que variam bastante entre analisadores tais como ‘ion-trap’, ‘Q-TOF’ e ‘TOF/TOF’ [80].

O MALDI-TOF MS é um método altamente adequado para a análise de glicanas neutras e, com a matriz adequada, também para glicanas carregados negativamente [74, 75, 82-86]. Uma amostra contendo ambos os tipos de glicanas gera um problema, que pode ser resolvido por uma derivatização que lhes atribui uma carga negativa [87,88] ou por derivatização dos grupos carboxilo dos ácidos siálicos [89,90-92]. Muitas vezes, os ácidos siálicos presentes em glicanas são derivatizados por permetilação, tornando-as neutras, o que confere vantagens adicionais na sua análise por MS/MS [62,93,94]. MALDI-TOF MS de glicanas permetiladas é intensamente utilizado como método para gerar perfis das glicanas [62].

A ‘Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/Proteome Initiative’ realizou um estudo multi-institucional com o objetivo de comparar metodologias utilizadas para a análise de *O*-glicanas. Foram analisadas uma variedade de metodologias cromatográficas e de espectrometria de massa representantes de abordagens atuais. Os dados mais fiáveis foram obtidos através de duas estratégias principais: a) análise direta por MS de misturas de *O*-glicanas reduzidas e permetiladas no modo de íons positivos, e (b) análise de glicanas nativas reduzidas no modo de íons negativos, utilizando abordagens de LC-MS [94].

I.11. Efeitos morfológicos e fisiológicos provocados pelo polipéptido Blad em *C. albicans*

De forma a estudar os efeitos morfológicos e fisiológicos do polipéptido Blad em *C. albicans* foi analisada a viabilidade e a integridade da sua parede celular, recolhendo amostras ao longo da curva de crescimento e visualizando-as num microscópio de fluorescência. Foram adicionados dois fluorocromos às amostras, FUN-1, indicador de atividade metabólica, consequentemente, viabilidade, e ‘Calcofluor white’, marcador de parede celular. Os resultados obtidos sugerem que ao fim de 12 horas de incubação com concentração letal do polipéptido Blad, as células tornam-se metabolicamente inativas, não viáveis e não cultiváveis. No entanto, não se verificam alterações visíveis ao nível da integridade da parede celular de *C. albicans*. Depois de ser exposto por mais de 12 horas para a concentração letal do polipéptido Blad (250 µg/mL), algumas células de *C. albicans* mostraram perda na integridade da membrana plasmática, revelada pela coloração com iodeto de propídio (que é impermeável à membrana plasmática de células viáveis, revelando que houve perda da integridade da membrana), mas, no entanto, não se observaram alterações na parede celular (coloração ‘Calcofluor white’) [95].

A imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização da interação antígeno-anticorpo, em suspensões de células. O polipéptido Blad funciona como antígeno assim que um anticorpo anti-Blad produzido em coelho é adicionado, seguindo-se a adição de um segundo anticorpo anti-coelho produzido em cabra, que é conjugado com FITC. Células de *C. albicans* foram incubadas com Blad durante 24 horas e, em seguida, a suspensão de células foi fixada em lâminas de vidro para observação ao microscópio de fluorescência. Na Figura 5 (1a e 2a) observa-se uma fluorescência verde à volta das células (Figura 5 (1c e 2c)). Este resultado mostra que após 24 h de incubação, o polipéptido Blad se liga ao envelope celular mas não penetra o interior da célula. Além disso, a coloração com Calcofluor white revela que a parede celular da célula permanece intacta (Figura 5 (1b e 2b)) [95].

Os ensaios de imunofluorescência revelaram, numa primeira fase, que o polipéptido Blad se liga ao envelope celular, sem desestabilizar a parede celular, mas no entanto não penetra o interior da célula. Com o objetivo de esclarecer se a ligação do polipéptido Blad à célula se dá ao nível da membrana plasmática ou da parede celular, realizou-se novo

ensaio de imunofluorescência com esferoplastos de *C. albicans*. Dos resultados exibidos na Figura 6 é possível assumir que o polipéptido Blad se liga à membrana plasmática (Figura 6 (1a e 1c)) pois a coloração com ‘Calcofluor white’ indica a ausência de parede celular (coloração azul não visível), como se pode observar na Figura 6 (1b). Além disto, o polipéptido Blad está claramente na periferia do protoplasto, sem traços do polipéptido no interior.

Este ensaio revelou que o polipéptido Blad se liga à membrana celular, sem vestígios do mesmo no interior da célula. O procedimento resultou também numa extensa destruição de esferoplastos, sendo que o polipéptido Blad pareceu ligar-se a muitos dos fragmentos celulares [95].

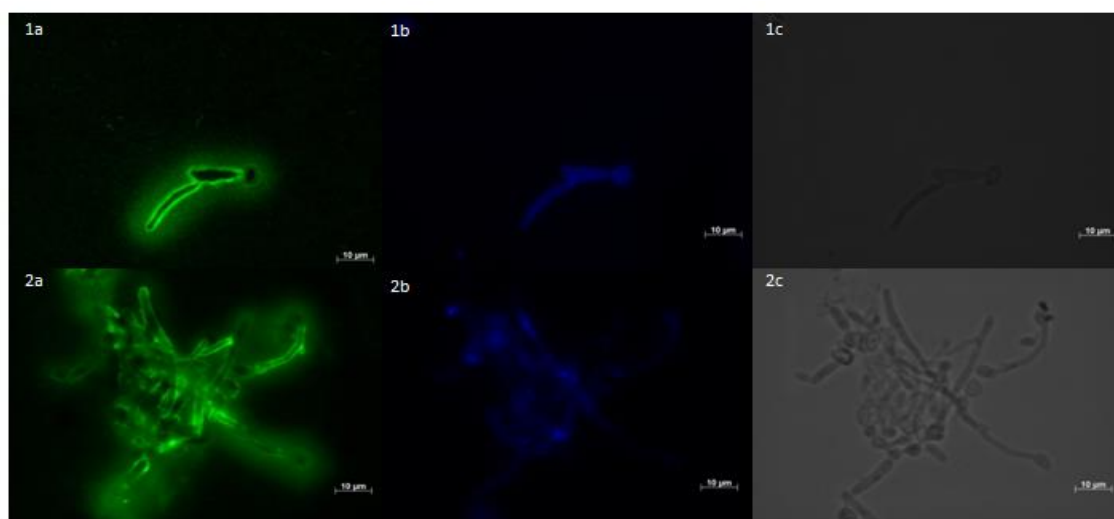


Figura 5. Imunofluorescência em *C. albicans* incubada com o polipéptido Blad durante 24 horas. O polipéptido Blad funciona como um antígeno; anticorpo primário anti-Blad produzido em coelho; anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra, conjugada com FITC. Filtro FITC (a), Filtro DAPI (b) e microscopia de campo claro (c). Barra corresponde a 10 µm. [95].

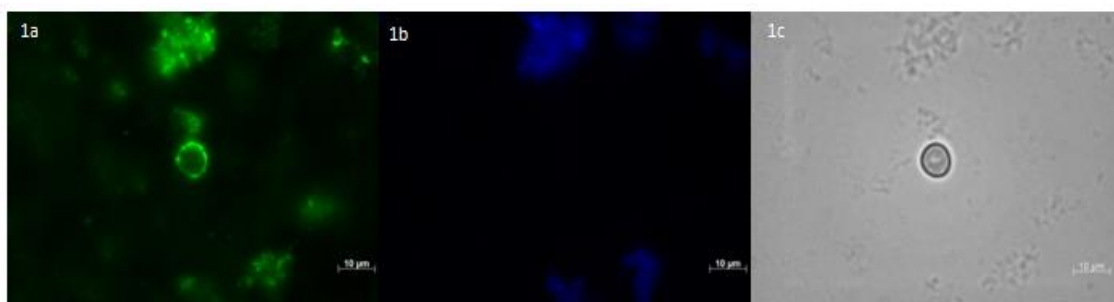


Figura 6. Imunofluorescência em esferoplastos de *C. albicans* incubados com o polipéptido Blad durante 24 horas. O polipéptido Blad funciona como um antígeno;

anticorpo primário anti-Blad produzido em coelho; anticorpo secundário anti-coelho produzido em canra, conjugada com FITC. Filtro FITC (a), Filtro DAPI (b) e microscopia de campo claro (c). Barra corresponde a 10 μ m. [95].

I.12. Extração e solubilização de proteínas membranares

De forma a estudar interações fisiologicamente relevantes de proteínas, estas devem ser mantidas em condições aquosas e não desnaturantes [96]. No entanto, no estudo de proteínas de membrana integrais, estas têm de ser solubilizadas através do uso de detergentes, que muitas das vezes tendem a afetar a atividade da proteína e a destabilizar as proteínas e as suas interações. As proteínas de membrana integrais são usualmente suscetíveis a agregação e precipitação na ausência da membrana plasmática, pois estas proteínas são de natureza hidrofóbica [97].

Existem detergentes suaves (i.e. não iónicos. Ex: Triton X-100, NP40, Tween 20) que solubilizam a membrana plasmática através da formação de micelas mistas fosfolípido/detergente/proteína, mas mesmo sendo detergentes suaves para algumas proteínas, podem alterar as propriedades de outras proteínas. Através da ação do detergente as proteínas que estavam incorporadas na membrana são removidas, expondo as regiões hidrofóbicas da proteína. As novas áreas expostas da proteína podem levar a ligação não específica causada por forças/interações hidrofóbicas [98].

Devido a todas as dificuldades e problemas associados com o estudo de proteínas membranares, estas são menos estudadas do que as proteínas solúveis, mesmo tendo em conta de que os genes que codificam proteínas de membrana integrais constituem cerca de 25 % do genoma humano, sendo estas os alvos primários para muitos fármacos [96].

I.13. Imunoprecipitação (IP)

A imunoprecipitação é um dos métodos mais usados para a deteção de antígenos e para a sua purificação. Numa IP um anticorpo monoclonal ou policlonal contra uma proteína específica alvo forma um imuno-complexo com esse alvo na amostra, como por exemplo num lisado celular. O imuno-complexo é depois capturado, ou precipitado, num

suporte ('beads') inerte, onde se encontra imobilizada uma proteína ligadora de anticorpo (tais como as proteínas A e G), e quaisquer proteínas em solução não precipitadas pelas 'beads' são lavadas. Finalmente, o antígeno (e anticorpo, senão estiver ligado covalentemente às 'beads' e/ou quando se usam tampões desnaturantes) é eluída a partir das 'beads' e analisada por SDS-PAGE, muitas das vezes seguindo-se imunodeteção por western blot de modo a verificar a identidade do antígeno [99-101].

I.13.1 Co-imunoprecipitação (Co-IP)

A co-imunoprecipitação (co-IP) é uma extensão da IP, e é baseada no potencial das reações IP em capturar e purificar o alvo primário (i.e. o antígeno) assim como outras macromoléculas que estão ligadas por interações nativas na solução/amostra. Portanto designa-se IP ou co-IP dependendo do foco ser o alvo primário (antígeno) ou alvos secundários (proteínas que interagem com o antígeno).

Enquanto a metodologia de co-IP é direta, realizar uma reação co-IP e identificar interações fisiológicas proteína-proteína pode ser difícil por causa da natureza da interação, ligação não específica dos componentes da IP e contaminação com o anticorpo que pode mascarar a deteção [99-101].

Devido à co-IP depender bastante das interações proteína-proteína, de forma a detetar as proteínas que estabeleceram ligação, a capacidade de manter interações fisiológicas estáveis ao longo dos stresses mecânicos e químicos da incubação e dos passos de lavagem, é um fator crítico a ter em conta quando se realiza uma co-IP. Portanto, interações de baixa afinidade ou interações proteína-proteína transientes podem não ser detetadas pela co-IP, a não ser que a interação possa ser estabilizada.

Um fator chave de forma a manter a formação do imunocomplexo ao longo dos passos requeridos para a co-IP são os tampões de lise e de lavagem. Muitas interações de proteínas irão permanecer intactas após a lise usando tampões de lise não-desnaturantes. Tampões com baixa força iónica (i.e., <120 mM NaCl) que contêm detergentes não iónicos (NP-40 e Triton X-100) são menos prováveis de causar ruptura de interações proteína-proteína; no entanto, testes empíricos podem ser necessários para determinar a melhor formulação de tampão para um complexo proteico de interesse [99-101].

Devido à presença de uma miríade de proteínas em lisados celulares, é inevitável que ocorra ligação não específica ao anticorpo da IP. Adicionalmente, devido às proteínas que estão normalmente separadas em compartimentos celulares discretos e que agora estão misturadas, é provável que ocorra ligação não fisiológica ao complexo proteico alvo [99-101].

Um dos problemas mais comumente encontrados em estratégias de IP ou co-IP são a interferência das bandas de anticorpo durante a análise por gel. Nesses casos onde várias proteínas podem co-precipitar com a proteína alvo, a presença de cadeias pesadas e leves (bandas de 25 e 50 kDa do anticorpo em SDS-PAGE redutor, respectivamente) co-eluídas na amostra pode causar desvirtuação nos resultados. A solução ideal seria analisar a co-IP sem a contaminação do antígeno eluído por parte do anticorpo. Com esta potencial interferência eliminada, apenas as proteínas co-imunoprecipitadas estariam presentes e seriam detetadas no gel.

A contaminação por parte do anticorpo pode ser evitada usando métodos tais como: ligação covalente do anticorpo às proteínas AG covalentemente ligadas às 'beads' ou ligação covalente do anticorpo a 'beads'. Um pormenor chave para prevenir a contaminação por parte do anticorpo usando estas estratégias é eluir o antígeno sob condições não desnaturantes; caso contrário, os fragmentos de anticorpo desnaturados podem ser eluídos juntamente com o antígeno.

Outra estratégia de ligação direta tem como base a ligação de associação entre a streptavidina e a biotina, na qual o anticorpo da IP é biotinilado e as beads são cobertas com streptavidina. Os imuno-complexos são capturados pelas beads, e devido à biotina ligar fortemente à streptavidina, o anticorpo não é eluído das beads quando condições suaves de eluição são usadas na libertação do antígeno alvo [99-101].

I.14. Objetivos do trabalho

O objetivo principal deste trabalho é identificar o (s) mecanismo (s) de ação do polipéptido Blad pelo (s) qual (is) provoca a morte dos fungos. Sabe-se que o polipéptido Blad possui atividade antifúngica mas não se sabe qual o mecanismo molecular (modo de ação) exato que desencadeia a morte destes. Estudos anteriormente realizados

demonstraram que o polipéptido Blad possui atividades de N-acetil-glucosaminidase, quitosanase e atividade lectina. Outro trabalho, efetuado com o fungo patogénico modelo *Candida albicans*, permitiu concluir que o polipéptido Blad se liga à membrana plasmática deste, não entrando, no entanto, para dentro da célula. Não foi observada perda da integridade da parede celular nem ligação do polipéptido Blad a esta. Depois da destruição dos esferoplastos pelo polipéptido Blad, esta ligou-se a muitos dos fragmentos celulares. A membrana plasmática contém proteínas membranares que são indispensáveis ao funcionamento da célula, sendo que a maior parte destas proteínas são glicoproteínas. Como já foi referido, estudos anteriores revelaram que existe elevada probabilidade do polipéptido Blad provocar a morte de fungos atuando ao nível da sua membrana plasmática. Também se conhece a grande afinidade do polipéptido Blad para resíduos de natureza glicosídica, nomeadamente através da sua atividade lectina.

Com este trabalho pretende-se testar a hipótese do polipéptido Blad se ligar às glicoproteínas da membrana plasmática, e deste modo desencadear um evento molecular/celular na membrana que leve à morte da célula. A primeira etapa deste trabalho consiste em identificar as glicoproteínas da membrana plasmática às quais o polipéptido Blad se liga e de seguida proceder ao seu isolamento. As glicoproteínas isoladas irão ser desglicosiladas para que, por espectrometria de massa, se possa caracterizar, a porção proteica e a porção das glicanas das glicoproteínas com afinidade com o polipéptido Blad.

Recorrendo a bases de dados irá ser feita uma pesquisa em relação à função das glicoproteínas identificadas na membrana plasmática, o que irá permitir elucidar sobre alvos prováveis do polipéptido Blad nas células dos fungos, o que, potencialmente, poderá estar relacionado com o mecanismo de ação do polipéptido Blad que provoca a morte dos fungos. Uma vez que os alvos específicos de ligação do polipéptido Blad serão possivelmente a glicanas das glicoproteínas, a identificação da sua estrutura e da sua composição irá permitir encontrar um padrão de interação que pode abrir o conhecimento para encontrar outras aplicações/agentes patogénicos que também possam ser sensíveis ao polipéptido Blad.

II - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

II.1. Extração e isolamento do polipéptido Blad dos cotilédones das plântulas de tremçoço (*Lupinus albus*)

A extração das proteínas solúveis totais dos cotilédones da plântula de tremçoço (*Lupinus albus*) foi feita de acordo com o método descrito por Monteiro et al. (2010) [1]. Os cotilédones das plântulas germinadas foram macerados num almofariz e pilão com um tampão de solubilização de globulinas (2 mL/g de peso fresco; de tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5, contendo 10% (m/v) de NaCl, 10 mM de EDTA e 10 mM EGTA. O extrato foi suavemente agitado durante 30 minutos a 4°C e depois filtrado através de três camadas de gaze. A solução contendo as globulinas foi centrifugada a 30 000 g, durante 1 hora a 4°C e depois filtrada novamente. O sobrenadante resultante foi dessalinizado em colunas PD-10 de acordo com as instruções do fabricante [102], previamente equilibradas em tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,5,

Após a obtenção da fração de globulinas totais presentes nos cotilédones do tremçoço, tal como explicado em cima, as globulinas individuais foram fracionadas e purificadas por cromatografia de troca aniónica “AKTA purifier”, numa coluna de Q-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences , W = 1 cm, h = 8 cm, caudal = 1.5 mL/min) essencialmente tal como descrito por Ferreira et al. (1995) [7]. As proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente de NaCl (0 a 1 M), tendo-se recolhido a fração contendo a proteína de 210 kDa no qual o polipéptido Blad está incorporado, tendo esta fração sido eluída entre 0,25 - 0,35 M de NaCl. Posteriormente esta fração foi dessalinizada em colunas PD-10 de acordo com as instruções do fabricante [102], previamente equilibradas com água destilada a pH 7,5 e, em seguida, liofilizada.

II.2. Quantificação das proteínas

A quantidade de proteína nas amostras foi determinada de acordo com uma modificação do método de Bradford, tal como descrito por Bradford (1976) [103]. As amostras foram lidas num espectrofotómetro, a 595 nm, e a albumina de soro bovino (BSA) foi usada como padrão.

II.3. Formação de esferoplastos de *Candida albicans*

Procedeu-se a uma cultura de células de *C. albicans* numa placa com meio GYP (Glucose Yeast Peptone) durante a noite, a 35°C. Com uma ansa retirou-se uma pequena porção, inoculou-se em 1 mL de meio YPD (Yeast Peptone Dextrose), agitou-se, e adicionaram-se 20 e 40 µL em 200 mL de YPD, em erlenmeyers de 500 mL. As células da cultura fresca foram cultivadas durante a noite a 30°C e com agitação de 150 rpm.

A densidade óptica (DO) a 600 nm foi então medida e selecionou-se a cultura que possuía o valor de DO mais próximo de 0,1. Inoculou-se a quantidade necessária em meio YPD, num erlenmeyer de 1 L, de modo a que o volume final fosse de 400 mL. Repetiu-se este passo para mais 4 erlenmeyers de modo a que o volume total fosse de 2 L. Incubaram-se as culturas a 30°C com agitação de 150 rpm até a DO a 600 nm alcançar valores entre 0,2 e 0,3, colocando-as depois à temperatura ambiente. As culturas foram divididas em frações de 50 mL num total de 40 ‘falcons’ e centrifugadas a 1500 g durante 7 minutos, à temperatura ambiente. Dividiram-se os ‘falcons’ em 4 grupos, ou seja, 10 ‘falcons’ por grupo. Decantou-se o sobrenadante e descartou-se. Ressuspendeu-se o sedimento de 10 ‘falcons’ em 40 mL de água destilada estéril num só ‘falcon’, resultando em 4 ‘falcons’ contendo cada um o sedimento ressuspendido que acumulou dos 10 ‘falcons’. De seguida, os 4 ‘falcons’ foram centrifugados a 1500 g durante 5 minutos à temperatura ambiente, tendo-se descartado o sobrenadante. As células em cada ‘falcon’ foram ressuspendidas e lavadas com 40 mL de SED (1 M Sorbitol, 25 mM EDTA, DTT 1 M, pH 8,0), tendo sido centrifugadas durante 5 minutos a 1500 g e à temperatura ambiente, e o sobrenadante descartado. De seguida, as células em cada ‘falcon’ foram ressuspendidas e lavadas com 40 mL de sorbitol 1 M. As células foram centrifugadas durante 7 minutos a 1500 g e à temperatura ambiente, tendo sido descartado o sobrenadante. Posteriormente as células em cada ‘falcon’ foram ressuspendidas por agitação manual, em 40 ml de tampão SCE (sorbitol 1 M, EDTA 1 mM, citrato de sódio 10 mM pH 5.8). Retirou-se a solução de Zymolyase de -20 °C e colocou-se em gelo, homogeneizando-se ao dar pequenos toques com o dedo e pipetando. Adicionaram-se 60 µL de Zymolyase (3 mg/mL em água MiliQ) a cada um dos 4 ‘falcons’ contendo as células suspensas em tampão SCE, e incubou-se a 30 ° C com agitação de 50 rpm. Em intervalos regulares de 15 min, 200 µL da suspensão foram recolhidos, adicionados a 800 µL de SDS a 5% e a DO foi medida a 800 nm, de

forma a calcular a percentagem de esferoplastos formados, sendo no mínimo 80 % um valor adequado para prosseguir com o procedimento. A percentagem de formação de esferoplastos foi determinada usando a equação: % esferoplastos = $100 - [(DO_{800} \text{ ao } t = t / DO_{800} \text{ ao } t = 0) \times 100]$. Depois da percentagem de formação de esferoplastos ultrapassar os 80 % em cada um dos 4 ‘falcons’, foram centrifugados a 750 g durante 5 minutos e à temperatura ambiente, tendo-se descartado o máximo possível de sobrenadante. Em seguida ressuspenderam-se e lavaram-se com agitação suave manual os esferoplastos sedimentados em cada um dos 4 ‘falcons’ com 40 mL de sorbitol 1 M e centrifugou-se a 750 g durante 5 minutos e à temperatura ambiente, tendo-se descartado o máximo possível de sobrenadante. Em seguida os esferoplastos sedimentados em cada ‘falcon’ foram ressuspensos e lavados com 40 mL de CaS (1 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de $CaCl_2$) com agitação suave manual. A suspensão foi centrifugada a 750 g durante 5 minutos e à temperatura ambiente, tendo-se descartado o máximo possível de sobrenadante. Ressuspenderam-se em 12 mL de CaS, os esferoplastos sedimentados em cada um dos 4 ‘falcons’ num só ‘falcon’. Os esferoplastos foram mantidos à temperatura de -80°C até serem necessários.

II.4. Isolamento das membranas plasmáticas a partir de esferoplastos de *Candida albicans*

Depois da centrifugação dos esferoplastos de *C. albicans* a 1100 g durante 5 minutos, o sedimento foi incubado entre 0-4°C durante 15 minutos em 10 volumes de tampão fosfato 5 mM, a pH 8,0, de modo a promover a lise celular. Depois da incubação, as membranas plasmáticas foram precipitadas por centrifugação a 20000 g durante 10 min e a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de solução salina NaCl 0.9 M, e armazenado a -80°C até ser usado.

II.5. Ligação da Blad purificada à membrana plasmática de *Candida albicans*

Depois da lise dos esferoplastos de *C. albicans* e isolamento das membranas plasmáticas, estas foram subsequentemente utilizadas como alvo para ligar o polipéptido Blad. O polipéptido Blad liofilizado foi dissolvido em solução salina de NaCl 0,9 M ou em água Milli Q. Foram incubadas 250 µg do polipéptido Blad com 200 µL de membranas de *C. albicans*, com agitação suave, de aproximadamente 80 rpm, durante 30 min a 25°C. Após a incubação, o homogeneizado foi lavado cinco vezes com 500 mL de soro fisiológico e centrifugado durante 5 minutos a 7800 g, e as outras quatro vezes durante 8 minutos a 14000 g. O sedimento foi então ressuspenso em 500 µL de soro fisiológico e armazenado a -80°C até à sua utilização.

II.6. Extração das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*

As membranas plasmáticas previamente isoladas a partir dos esferoplastos de *C. albicans* foram centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos. Por cada 50 mg do sedimento resultante da centrifugação adicionaram-se 500 µL de tampão de lise/lavagem (IP Lysis/Wash Buffer) (pH 7,4, 0,025 M Tris, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1% NP40, 5 % glicerol) gelado, tendo-se incubado em gelo durante 5 minutos com agitação periódica. Removeu-se o ‘debris’ celular por centrifugação a 13000 g durante 10 minutos e recolheu-se o sobrenadante contendo as proteínas extraídas da membrana plasmática de *C. albicans* e guardou-se a -20°C até ser utilizado.

II.7. SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes

Todas as amostras de proteína foram precipitadas com 80% (v/v) de acetona gelada, a -20°C durante 30 minutos e depois centrifugadas a 15000 g, durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em tampão de amostra contendo 0,08 M Tris-HCl a pH 6,8, 0,1% (m/v) β-2-mercaptoetanol, 2% (m/v) SDS, 15% (m/v) glicerol e 0,006% (m/v) de

uma solução de *m*-cresol violeta a 1% dissolvida em etanol (m/v). De seguida as amostras foram homogeneizadas no vortex e fervidas num banho de água durante 3 min.

Foram usados géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) num sistema descontínuo com um gel de concentração e separação. Foram utilizados 2 tipos de mini-géis de concentração de acrilamida de 12,5%, 15% e 17,5%. O gel de separação de 12,5% foi feito com: 12,5% (m/v) acrilamida, 0,13% (m/v) bis-acrilamida, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,03% (v/v) tetrametilietilenediamina (TEMED) e 0,03 % (w/v) persulfato de amónio (PSA). O gel de concentração foi feito com: 5% (m/v) acrilamida, 0,13% (m/v) bis-acrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,05% (v/v) tetrametilietilenediamina (TEMED) e 0,1% (m/v) persulfato de amónio (PSA).

A eletroforese foi realizada num sistema vertical Mini-PROTEAN^R Tetra System (Biorad) usando mini-géis, com adição de tampão de cátodo composto por 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glicina e 0,1% (m/v) SDS. Como padrão foi usado o marcador 'Precision Plus ProteinTM All Blue Standards marker (kDa)', um marcador da BioRad, que possui uma gama de 10 a 250 kDa.

A eletroforese correu a 30 mA e a 200 V, usando o equipamento Power PacTM Basic da Biorad). A migração dos polipéptidos foi interrompida quando o *m*-cresol chegou ao limite inferior do mini-gel.

II.8. Focagem Isoelétrica

Todas as amostras de proteína previamente extraída das membranas plasmáticas de *C. albicans* foram precipitadas com acetona gelada de 80% (v/v), à temperatura de -20°C durante 30 minutos, e depois centrifugadas a 15000 g durante 10 min e à temperatura de 4°C. O sedimento foi ressuspensão num tampão de reidratação contendo 7 M (m/v) de ureia, 2 M (m/v) de tiourea, 2% (v/v) nonilfenoxipoliétoxietanol (NP-40) e 1% (m/v), ditiotretol (DTT). Uma solução-tampão de IPG 0,5 % (v/v) foi também adicionada.

As amostras foram então colocadas sobre uma tira longa com 7 cm de gel com gradiente de pH (3-10) imobilizado (Bio-Rad). As tiras foram colocadas sobre o equipamento celular (Bio-Rad), onde tem lugar a focagem isoeletrica. O programa de focagem isoeletrica foi composto pelas seguintes etapas: reidratação: 50 V, 12 h; 1º passo:

250 V/h; 2º passo: 500 V/h; 3º passo: 8000 V, 2,5 h; 4º passo: 8000 V, 3000V/h. No final, as tiras foram incubadas numa solução contendo 50 mM Tris-HCl a pH 8,8, 6 M de ureia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS e 1% (w/v) de DTT, durante 15 min com agitação. Esta solução foi removida e as tiras foram re-incubadas numa solução contendo 50 mM Tris – HCl a pH 8,8, 6 M de ureia, 30% (v/v) de glicerol, 2% (m/v) de SDS e de 2,5% (m/v) iodoacetamida, durante 15 min com agitação. Após estas incubações, cada tira foi colocada no topo de um mini-gel de poliacrilamida de SDS-PAGE e selada com 0,5% (m/v) de agarose. A eletroforese correu a 5 mA durante 15 minutos e depois a 10 mA, 220V.

II.9. Coloração das proteínas em gel de poliacrilamida

II.9.1. Coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250

Na coloração com Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB R-250), os polipéptidos presentes no gel foram fixados em 10% (m/v) de TCA durante 15 minutos. De seguida os mini-géis foram corados durante uma 1 hora, com uma solução contendo 0,25% (m/v) CBB R-250, 25% (v/v) de 2-propanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial. A solução de descoloração composta por 25% (v/v) de 2-propanol e 10% (v/v) de ácido acético glacial foi mantida até que os polipéptidos pudessem ser visualizados.

II.9.2. Coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250

Na coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), os polipeptídeos presentes nos mini-géis foram fixados numa solução contendo 2% (v/v) de ácido fosfórico e 50% (v/v) de metanol, durante 90 minutos, seguindo-se três lavagens com água destilada de 30 minutos cada. O processo de incubação foi feito com uma solução de 34% (v/v) de metanol, 17% (m/v) de sulfato de amónio e 2% (v/v) de ácido fosfórico, durante 1h. Após a incubação, a solução de coloração contendo 1,1% (m/v) de Coomassie G-250 em 34%

(v/v) de metanol foi adicionada. Esta etapa pode ocorrer durante a noite e ser prolongada até 5 dias. As lavagens finais foram efetuadas com água Milli-Q.

II.9.3. Coloração com nitrato de prata

Na coloração com nitrato de prata, os mini-géis foram incubados em 50% (v/v) de metanol, 12% (v/v) de ácido acético e 0,05% (v/v) de solução de formaldeído, durante 20 minutos ou durante a noite; depois de três lavagens de 10 minutos em 50% de etanol, o gel foi incubado 1 minuto numa solução de pré-tratamento (0,02% (m/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), lavada três vezes com água Milli-Q. Posteriormente foi aplicada a solução de desenvolvimento da coloração (60 g/L Na_2CO_3 , 0,5 mL/L formaldeído, 4 mg/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) até se atingir a intensidade de cor desejada; para parar esta reação, o gel foi incubado com uma solução de paragem (50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ácido acético), durante pelo menos 5 minutos.

II.10. Transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose e ensaios de imunodeteção.

As proteínas separadas por eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e eletroforese bidimensional foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, previamente embebida em tampão de transferência (etanol (96%) a 20% (v/v), Transblot Turbo 5x transfer buffer (Biorad) a 20% (v/v)), e transferidas a 2,5 A ,15 V durante 28 minutos utilizando um sistema de transferência semi-seco “Trans-Blot^R Turbo transfer system” (Biorad). Após a transferência das proteínas, os polipéptidos na membrana de nitrocelulose foram fixados através da fervura em água Milli Q durante 10 min. O total de polipéptidos na membrana foi visualizado com Ponceau S. A membrana foi lavada durante 1 minuto com água, incubada com uma solução de Ponceau S 0,026 M contendo 1,8 M de ácido tricloroacético e 1,2 M de ácido sulfossalicílico até ser visualizados os polipéptidos, e lavada durante 5 minutos com água.

A membrana de nitrocelulose, contendo os polipéptidos fixados, foi incubada durante 1 hora com PBS (137 mM NaCl, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM e KCl 2,7 mM) contendo 0,05% (m/v) de Tween 20, 3% (m/v) de leite em pó e 300 $\mu\text{g/mL}$ de Blad. Depois disso, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo anti-Blad produzido em coelho, 500 vezes diluído em PBS contendo 0,05% (m/v) de Tween 20 e 3% de leite em pó (Molico da Nestlé - sem gordura e com caseína, de modo a bloquear toda a superfície livre da membrana com caseína, de modo a evitar contaminação da membrana). Após 1 hora, a membrana foi lavada duas vezes durante 5 minutos, com PBS contendo 0,1% (m/v) de Tween 20 e, em seguida, com uma solução de sal (NaCl 1 M, 0,01 M de Na_2HPO_4 e 0,5% (m/v)) de Tween 20. Antes de serem incubadas com o segundo anticorpo, a membrana foi lavada uma vez, durante 15 minutos, com PBS contendo 0,05 % (m/v) de Tween 20 e 3% de leite em pó. Após estas lavagens a membrana foi incubada durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-coelho produzido em cabra (Sigma), diluído 7000 vezes em PBS contendo 0,05% (m/v) de Tween 20 e 3% de leite em pó. A membrana foi então lavada duas vezes durante 5 minutos com PBS contendo 1% (m/v) de Tween 20 e uma vez com a solução de sal durante 10 minutos. Depois disso, a membrana foi lavada três vezes durante 5 minutos com PBS contendo 0,1% (m/v) de Tween 20 e uma vez com PBS durante 1 minuto. A membrana de nitrocelulose foi sempre mantida à temperatura ambiente com agitação suave.

De acordo com o objetivo do ensaio, um anticorpo primário foi utilizado nos ensaios de imunodeteção, um Blad-específico produzido em coelho. Utilizou-se também um segundo anticorpo específico conjugado com fosfatase alcalina para anticorpos primários, tendo sido produzido em cabra (Sigma).

Para a revelação do sinal, a membrana foi coberta numa solução de substrato Lumi-PhosTM WB (Pierce Thermo scientific), um substrato quimioluminescente extremamente sensível para a detecção do anticorpo secundário que possui a fosfatase alcalina conjugada com este. O sinal foi observado num equipamento ChemiDocTM XRS + (Molecular Imager, BioRad).

II.11. Incubação das membranas de nitrocelulose com ácido periódico

Procedeu-se à desglicosilação das glicoproteínas das membranas plasmáticas de *C. albicans*, com o intuito de testar se o polipéptido Blad participa em ligações proteína/açúcar com as glicoproteínas da membrana plasmática. Antes do ensaio de imunodeteção e depois da transferência das proteínas de membrana do gel de acrilamida para a membrana de nitrocelulose, estas foram submetidas a desglicosilação parcial e total. A desglicosilação parcial foi efetuada incubando a membrana com 12,5 mM de ácido periódico em solução de 0,01 M acetato de sódio a pH 5, uma hora no escuro. A desglicosilação total foi efetuada incubando a membrana com 100 mM de ácido periódico em solução de 0,01 M acetato de sódio a pH 5, durante duas horas no escuro. Como controlo incubou-se uma membrana de nitrocelulose contendo as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, com solução de 0,01 M acetato de sódio a pH 5.

II.12. Incubação das membranas de nitrocelulose a diferentes pH's

Procedeu-se a um teste de exposição das glicoproteínas da membrana plasmática transferidas para membrana de nitrocelulose, já previamente incubadas com o polipéptido Blad, a diferentes pH's, com o intuito de obter mais informação sobre a natureza da ligação do polipéptido Blad às glicoproteínas. As proteínas, já previamente transferidas para a membrana de nitrocelulose e incubadas com o polipéptido Blad, foram incubadas depois, durante uma hora, com 0,01 M de acetato de sódio com os seguintes pH's: 3,5 e 7,5.

II.13. Co-Imunoprecipitação do polipéptido Blad conjuntamente com as proteínas de *C. albicans* com afinidade a este

Incubaram-se as proteínas previamente extraídas da membrana plasmática de *C. albicans*, com uma solução contendo o polipéptido Blad durante 1 hora à temperatura

ambiente, e de seguida com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho durante 1 hora à temperatura ambiente.

Colocaram-se 50 μ L (0,50 mg) de 'Pierce Protein A/G Magnetic Beads' num tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Adicionaram-se 375 μ L de tampão de lavagem às 'beads' magnéticas e levou-se a homogeneizar gentilmente ao vortex. Colocou-se o tubo num suporte magnético para recolher as 'beads' contra a superfície lateral interior do tubo. Removeu-se e descartou-se o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta. Adicionou-se 1,5 mL de tampão de lavagem ao tubo. Inverteu-se várias vezes o tubo durante 1 minuto. De seguida recolheram-se as 'beads' magnéticas com um suporte magnético, tendo sido também removido e descartado o sobrenadante. Adicionou-se a amostra contendo as proteínas, o polipéptido Blad e o anticorpo anti-Blad ao tubo de microcentrifuga, contendo as 'beads' magnéticas lavadas, e incubou-se à temperatura ambiente por 1 hora com agitação. Isolaram-se novamente as 'beads' magnéticas contra a superfície interior lateral do tubo usando o suporte magnético, e recolheu-se a solução para posterior análise.

Adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem ao tubo e agitou-se suavemente. Recolheram-se as 'beads' no suporte magnético e descartou-se o sobrenadante. Repetiu-se esta lavagem por mais duas vezes. Adicionou-se 1 mL de água Milli-Q e homogeneizou-se suavemente. Recolheram-se as 'beads' no suporte magnético e descartou-se o sobrenadante.

Na primeira eluição adicionaram-se 100 μ L de tampão de eluição (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0). Incubou-se à temperatura ambiente e com agitação durante 10 minutos. Separaram-se as 'beads' magnéticas no suporte magnético e recolheu-se o sobrenadante contendo o alvo do antigénio presente nas mesmas.

Na segunda eluição adicionaram-se 100 μ L de tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol, 60 mM Tris-HCl), ao tubo e aqueceram-se as amostras a 100°C num banho de água a ferver durante 10 minutos. Separaram-se as 'beads' magnéticas no suporte magnético e recolheu-se o sobrenadante contendo o alvo do antigénio presente nas mesmas.

II.14. Espectrometria de massa de proteínas

II.14.1. Digestão trípica em gel

Nos géis de poliacrilamida corados com Coomassie G-250, cortaram-se as bandas de interesse e colocaram-se em diferentes eppendorfs. Posteriormente lavou-se com 50 μ L de hidrogenocarbonato de amónio 50 mM (Buf1) com um período de incubação de 30 min, depois dos 30 minutos adicionaram-se de 50 μ L de acetonitrilo e incubou-se durante 30 minutos. Após este tratamento, retirou-se o sobrenadante e o processo repetiu-se novamente. Novamente, adicionaram-se 50 μ L de acetonitrilo, e removeu-se este após um tempo de incubação de 10 minutos e secou-se as bandas na SpeedVac (Plus SC 210 A, Thermo Savant). Às bandas secas adicionaram-se 20 μ L de tripsina (um *vial* ressuscitado em 2 mL de Buf1) e incubou-se durante 1 h a 37°C. Após este período, adicionou-se Buf1 de forma a cobrir todos os fragmentos de gel, seguindo-se uma incubação durante a noite a 37 °C.

Para a extração dos péptidos resultantes da digestão, recolheram-se os sobrenadantes para novos eppendorfs e aos fragmentos dos géis adicionaram-se 25 μ L de ácido fórmico 10%(v/v), e incubou-se durante 30 minutos. Após este tempo, recolheram-se os sobrenadantes para os novos eppendorfs. Aos fragmentos dos géis adicionaram-se 25 μ L de ácido fórmico e 25 μ L de acetonitrilo e incubou-se durante 30 minutos, e a seguir removeu-se os sobrenadantes para os eppendorfs. Repetiu-se o último passo. Por fim, secaram-se os digestos, presentes nos sobrenadantes recolhidos na SpeedVac (Plus SC 210 A, Thermo Savant).

Aplicou-se diretamente os péptidos numa placa de MALDI misturando com a matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico preparada em 570% de acetonitrilo e 0.1% de ácido trifluoroacético).

II.14.2. Espectrometria de massa

Efetuararam-se os espectros dos péptidos resultantes da digestão trípica num espectrómetro de massa MALDI-TOF-TOF (4800 Proteomics Analyzer; Applied

Biosystems) com o reflectron em modo positivo e obtidos espectros no intervalo de massas desde os 800-4000 Da.

II.14.3. Identificação das proteínas

Processaram-se e analisaram-se os espectros pela “Global Protein Server Workstation”, da Applied Biosystems, utilizando o software Mascot (Matrix Science Ltd, UK) para a pesquisa dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da SwissProt (release date 13092014) na taxonomia de *mammals* e *fungus*. As identificações de proteínas foram aceites com diferentes graus de confiança dos dados de MS e com diferentes graus de confiança dos dados de MS/MS.

II.15. Bioinformática

II.15.1. Ferramenta bioinformática Phyre

A abordagem geral com mais sucesso para efetuar previsões de estrutura de proteínas envolve a deteção de homólogos com estrutura tridimensional (3D) conhecida, também comumente designada por modelação baseada na homologia de modelos padrão ou modelação baseada no reconhecimento de enovelamento. Estes métodos baseiam-se na observação de que o número de enovelamentos na natureza parece ser limitado e de que muitas sequências de proteínas remotamente homólogas adotam estruturas similares [104]. Portanto, dada uma sequência de uma proteína de interesse, pode comparar-se a sua sequência com as sequências de proteínas com estruturas determinadas experimentalmente. Se uma sequência homóloga puder ser encontrada, um alinhamento entre as duas sequências pode ser gerado e usado para construir diretamente um modelo 3D da sequência proteica de interesse [105]. As aplicações práticas da previsão de estrutura tridimensional de proteínas são muitas e variadas, incluindo o desenvolvimento de hipóteses ao nível funcional de proteínas hipotéticas [106], o aperfeiçoamento de sinais de fase em

cristalografia [107], a seleção de sítios para mutagénese [108] e o design racional de fármacos [109].

A ferramenta bioinformática de previsão/modelação de estruturas de proteínas utilizada neste trabalho para efetuar uma previsão/modelação da estrutura tridimensional do polipéptido Blad, já que a sua estrutura tridimensional não foi ainda determinada experimentalmente, foi o Phyre [105]. Este utiliza uma base de dados de proteínas com estrutura conhecida retirada da base de dados de Classificação Estrutural de Proteínas (Structural Classification of Proteins (SCOP) database) [110] e aumentada ainda por novas deposições no Banco de Dados de Proteína (Protein Data Bank – PDB) [111]. A sequência de cada uma dessas estruturas é corrida/analisaada contra uma base de dados de sequências não redundantes, sendo construído para cada uma delas um perfil (Hidden Markov Model (HMM)). A estrutura secundária conhecida e prevista dessas proteínas é armazenada na base de dados de enovelamento. A sequência de uma proteína de interesse (polipéptido Blad) para a sua modelação 3D, é similarmente analisada/corrida contra uma base de dados de sequências não redundantes de proteínas, e um perfil é construído para a proteína de interesse. São usadas 5 iterações de PSI-Blast (Position-Specific Iterated BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)) para agrupar as sequências homólogas à sequência da proteína de interesse. Depois da construção do perfil (HMM) da proteína de interesse, ocorre a previsão da estrutura secundária desta [105]. Na ferramenta bioinformática Phyre são usados três programas independentes de previsão de estrutura secundária: Psi-Pred [112], SSPro [113] e o Jnet [114]. Em adição, o programa Disopred [115] é utilizado para calcular uma previsão de ‘dois estados’, ou seja, quais as regiões da sequência da proteína de interesse estão mais provavelmente estruturalmente ordenadas (o) e de quais estão mais provavelmente estruturalmente desordenadas (d).

O perfil previamente gerado para a proteína de interesse (polipéptido Blad) e a sua previsão de estrutura secundária são analisadas contra a base de dados de enovelamento usando um algoritmo de alinhamento perfil-perfil (HMM-HMM) [116]. Este processo de alinhamento atribui um ‘score’, pelo qual os alinhamentos são hierarquizados. Os 10 alinhamentos que obtiveram maior ‘score’ são então usados para construir o modelo 3D da proteína de interesse. Quando possível, regiões ausentes ou inseridas, ocasionadas por inserções ou deleções no alinhamento gerado, são reparadas usando a ‘loop library’ e um procedimento de reconstrução/ajustamento. Por último as cadeias laterais dos aminoácidos

são inseridas no modelo da proteína de interesse usando um algoritmo ‘fast graph-based’ e uma base de dados de rotâmeros de cadeias laterais de aminoácidos [105].

II.15.2. Ferramenta bioinformática 3DligandSite

O 3DligandSite [117] é uma ferramenta bioinformática que permite a previsão de locais de ligação de ligandos em proteínas. Esta utiliza a estrutura da proteína de interesse, modelada tridimensionalmente pelo Phyre [105], e os ligandos presentes em estruturas de proteína homólogas à da proteína de interesse. O 3DligandSite foi considerado um dos melhores previsores de sítios de ligação em CASP8 [118, 119].

Os utilizadores podem submeter uma sequência de interesse ou a totalidade da estrutura de uma proteína. Quando uma sequência de interesse é submetida, o primeiro passo necessário é prever uma estrutura tridimensional da proteína utilizando a ferramenta bioinformática Phyre [120].

Para identificar as estruturas homólogas à estrutura da proteína de interesse que possuam ligandos ligados, o programa MAMMOTH [121] é usado para realizar uma análise/correspondência estrutural da estrutura modelada da proteína de interesse (modelada pelo Phyre) contra uma base de dados de estruturas de proteínas que possuem ligandos a estas ligados. Até aos melhores 25 ‘scores’ (usando MAMMOTH –lnE ‘score’ do MAMMOTH) de homologia em relação à estrutura da proteína de interesse são retidos para análise. Estas estruturas homólogas são alinhadas tridimensionalmente com a estrutura modelada da proteína de interesse usando o programa TMalign [122]. Ao ocorrer a remoção das estruturas homólogas com a retenção dos seus ligandos, estes ficam sobrepostos na estrutura tridimensional da proteína de interesse.

De modo a agrupar os ligandos é utilizado agrupamento de ligação única, ou seja cada ligando interage com um aminoácido da proteína. O agrupamento com o maior nº de ligandos é selecionado e os resíduos que estiverem até à distância de 0.8 Å dos ligandos do agrupamento são previstos fazerem parte do local de ligação. A conservação de resíduos é calculada utilizando o ‘score’ de divergência de Jensen Shannon [123] e fornecidos como um guia para o utilizador. A conservação de resíduos não é utilizada como parte do

processo de previsão do 3DligandSite. Informação sobre a conservação pode ser usada em conjugação com a previsão do 3DligandSite [117].

II.15.3. Ferramenta bioinformática STRING

A ferramenta bioinformática STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes) fornece uma cobertura abrangente única e facilidade de acesso a informação de interação/associação proteína-proteína, tanto experimental como prevista. As associações/interações em STRING são fornecidas com um ‘score’ de confiança, informação acessória referente a domínios de proteínas e estruturas 3D estão disponíveis, tudo isto dentro de um espaço de identificação estável e consistente [124].

As proteínas podem formar uma variedade de conexões/interações funcionais entre elas, incluindo complexos estáveis, vias metabólicas e um conjunto enorme de interações regulatórias diretas ou indiretas. Estas conexões podem ser conceptualizadas através de redes, em que o tamanho e organização destas redes fornecem uma oportunidade para analisar um genoma como algo mais do que apenas uma estática coleção de funções de genes [124].

O modo de visualização em rede num genoma está a ser cada vez mais utilizado em diversas áreas de biologia aplicada: ‘redes’ (networks) de proteínas são usadas para aumentar o poder estatístico em genética de humanos [125,126], na ajuda da descoberta de fármacos [127,128], para fechar lacunas no conhecimento metabólico de enzimas [129,130] e para prever fenótipos e funções de genes [131,132], nomeando apenas alguns exemplos.

Dados experimentais sobre interações físicas proteína-proteína estão maioritariamente armazenadas num grupo de bases de dados dedicadas que no seu conjunto formam o Consórcio Internacional de partilha molecular (International Molecular Exchange (IMEx) consortium) [133-140]. O conhecimento anotado de vias metabólicas está maioritariamente armazenado num conjunto separado de recursos [140-143] e ainda assim outras interações podem ser encontradas em bases de dados de vários organismos [144,145] ou recursos de ‘text-mining’ [146,147] Além disto um conjunto de algoritmos foram desenvolvidos para permitir previsão *de novo* de ‘links’ funcionais entre proteínas

[143-151], no entanto usualmente com consideráveis taxas de falsos-positivos e sem fornecer pistas no tipo e especificidade da interação [124].

As capacidades principais da STRING assentam na compreensibilidade única, no ‘scoring’ de confiança da associação/interação proteína-proteína e no interface interativo e intuitivo. A STRING é o único ‘site’ que cobre centenas (mais de 1100) de organismos- indo desde Bacteria e Archaea a humanos. O ‘confidence scoring’ é uma funcionalidade chave da STRING, fornecendo orientação aos utilizadores que desejam balançar diferentes níveis de cobertura e precisão [124].

Deve ser destacado que as interações/associações proteína-proteína na STRING não são limitadas a interações diretas, interações físicas entre duas proteínas. Alternativamente, as proteínas podem estar ligadas/relacionadas, como por exemplo podem exibir uma interação genética ou são reconhecidas por metabolizarem etapas subsequentes em vias metabólicas [124].

II.15.4. Ferramenta bioinformática ClusPro

De modo a estudar as possíveis interações entre o polipéptido Blad e as proteínas associadas à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação que foram identificadas neste trabalho, recorreu-se à previsão de ancoragem/‘docking’ de proteínas utilizando o ‘software’ ClusPro 2.0 (<http://ClusPro.bu.edu/>) [152]. Este ‘software’ demonstrou ser um dos melhores previsores de ‘docking’ de proteínas em CAPRI (Critical Assessment of Predicted Interactions) nas rondas 13-19 [153].

O ClusPro é uma ferramenta bioinformática, totalmente automatizada, que é utilizada para a previsão de ancoragem/‘docking’ de proteínas [154]. Este seleciona os melhores 1000 ‘scores’ das soluções para possíveis ancoragens, agrupando-as depois de acordo com considerações de ‘rmsd’ (root mean square deviation). Cada agrupamento é caracterizado pelo seu número de membros, pelo ‘score’ ClusPro do centro do agrupamento e pelo ‘score’ ClusPro mais baixo presente no agrupamento. O ClusPro fornece 4 conjuntos diferentes de resultados de ‘docking’ que são baseados no tipo de interações (Balanced; Electrostatic-favored; Hidrofobic-favored; VdW+Elec), mas é

aconselhado usar os coeficientes (Balanced) quando não se possui a informação sobre quais as forças/interações que dominam num determinado complexo de ancoragem. Os modelos de ancoragem são hierarquizados no ClustPro através do tamanho do agrupamento correspondente a cada modelo [152].

De forma a se obter a estrutura tridimensional das proteínas associadas à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad, que foram identificadas neste trabalho, efetuaram-se as previsões das suas estruturas tridimensionais com a ferramenta bioinformática Phyre, pois estas ainda não se encontram determinadas experimentalmente.

Em baixo encontra-se a informação sumária, fornecida pela ferramenta bioinformática Phyre, sobre a confiança na modelação das estruturas tridimensionais das proteínas associadas à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad:

Enolase 1- Confiança no modelo: 435 resíduos (99%) modelados com >90% de precisão.

Subunidade beta da ATP sintetase- Confiança no modelo: 117 resíduos (23%) modelados com >90% de precisão.

Sulfonato dioxigenase. Confiança no modelo: 0 resíduos (0%) modelados com >90% de precisão.

Álcool desidrogenase 1. Confiança no modelo: 0 resíduos (0%) modelados com >90% de precisão.

Com base nas diferentes confianças dos modelos previstos para as estruturas tridimensionais das proteínas associadas à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad, apenas foram selecionadas a enolase 1 e a subunidade beta da ATP sintetase para efetuar as previsões de 'docking' com o polipéptido Blad, utilizando o 'software' ClusPro 2.0.

De forma a efetuar a previsão de 'docking' entre a proteína enolase 1 e o polipéptido Blad no 'software' ClusPro 2.0, inseriu-se como recetor de ancoragem a proteína enolase 1 (estrutura tridimensional em formato pdb fornecida pela ferramenta

bioinformática Phyre), e como ligando de ancoragem o polipéptido Blad (estrutura tridimensional em formato pdb fornecida pela ferramenta bioinformática Phyre). Procedeu-se da mesma forma para a previsão de 'docking' entre a proteína subunidade beta da ATP sintetase e o polipéptido Blad no 'software' ClusPro 2.0.

III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.1. Formação de esferoplastos de *C. albicans*

De modo a investigar os alvos de ligação do polipéptido Blad na membrana plasmática de *C. albicans*, que provavelmente serão glicoproteínas que estão envolvidas no mecanismo de ação fungicida que o polipéptido Blad promove, foi necessário proceder à remoção da parede celular de *C. albicans*, de modo a obter esferoplastos. A formação dos esferoplastos foi um procedimento necessário para o posterior isolamento das membranas plasmáticas de *C. albicans*, que contêm as glicoproteínas que se pensa serem os alvos de ligação do polipéptido Blad. A Tabela 1 mostra a variação da densidade ótica (DO) a 800 nm da cultura de *C. albicans* ao longo do tempo, após adição de Zymolyase a esta, mostrando-se também a percentagem de formação de esferoplastos ao longo do tempo.

Tabela 1- Formação de esferoplastos de *C. albicans*. Variação da densidade ótica e da percentagem de formação de esferoplastos das células de *C. albicans* ao longo do tempo.

| Tempo (min) | DO 800nm | % esferoplastos |
|----------------|-------------|--------------------|
| 0 | 0,929 | 0 |
| 15 | 0,747 | 19,6 |
| 30 | 0,585 | 37,0 |
| 45 | 0,467 | 49,7 |
| 60 | 0,339 | 63,5 |
| 75 | 0,249 | 73,2 |
| 90 | 0,209 | 77,5 |
| 105 | 0,168 | 81,9 |
| 120 | 0,137 | 85,3 |

De modo a ser possível monitorizar o progresso da digestão da parede celular de *C. albicans* ao longo do tempo, pela qual a Zymolyase é responsável devido à sua ação lítica, a DO a 800 nm foi medida em intervalos de 15 minutos em aliquotas da cultura, após adição de SDS a estas. O SDS, ao interagir com os esferoplastos, provoca a sua ruptura e a solubilização das suas membranas plasmáticas, o que faz com que o feixe de luz a 800 nm interaja somente com as células que não foram lisadas pela interação do SDS, isto é, células em que a parede celular ainda não foi digerida. Deste modo a DO a 800 nm vai

sendo cada vez menor ao longo do tempo de ação da Zymolyase, devido à crescente quantidade de células com parede celular digerida, denominadas de esferoplastos.

Neste procedimento verificou-se a formação de 85,3% de esferoplastos de *C. albicans*, após 120 minutos de incubação com a Zymolyase. Esta percentagem de esferoplastos conseguida foi considerada suficiente para a sua utilização neste trabalho.

III.2. Análise por SDS-PAGE das proteínas totais da membrana de *C. albicans* incubadas com o polipéptido Blad

Numa primeira fase da investigação acerca dos alvos de ligação do polipéptido Blad nas membranas plasmáticas de *C. albicans*, procurou-se confirmar, por SDS-PAGE, a hipótese do polipéptido Blad se ligar às proteínas da membrana plasmática – Figura 7. Esta hipótese era suportada pelos dois seguintes factos acerca do polipéptido Blad: 1 - possui atividade de lectina podendo potencialmente ligar-se a glicoproteínas; 2 – em trabalhos realizados anteriormente demonstrou ligar-se à membrana plasmática de *C. albicans*, provocando a sua morte [99].

Na Figura 7, ‘lane’ 1, está representado o perfil eletroforético das proteínas dos esferoplastos da membrana plasmática de *C. albicans*. Na ‘lane’ 2 está representado o perfil eletroforético da proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad, sendo este observado a aproximadamente 20 kDa. São também observadas mais duas bandas abaixo com massas moleculares inferiores a 20 kDa, correspondentes a outros polipéptidos que constituem a proteína de 210 kDa. Seria esperada a visualização de mais bandas correspondentes a outros polipéptidos da proteína, mas o seu perfil eletroforético total não foi revelado devido à pequena quantidade de proteína desta ‘lane’, o que resultou de problemas associados à sua solubilização/precipitação. As ‘lanes’ 3 a 7 representam as consecutivas lavagens das membranas de *C. albicans* previamente incubadas com uma solução de polipéptido Blad durante 1 hora. É possível observar que ao longo das lavagens existe um decréscimo na concentração do polipéptido Blad adicionado em excesso libertado, compreendendo-se que em cada lavagem o excesso adicionado de polipéptido Blad vai desaparecendo, permanecendo o que efetivamente se ligou às membranas das células. É também possível visualizar-se nas ‘lanes’ de 3 a 7, algumas bandas

correspondentes às proteínas da membrana plasmática que ou ficaram solúveis no sobrenadante, e/ou ao toque da pipeta no precipitado, aquando da sucção da água das lavagens com a micropipeta, arrastou-as para o sobrenadante. Na ‘lane’ 8 observa-se o perfil eletroforético da amostra resultante da incubação da membrana plasmática de *C.albicans* com o polipéptido Blad, após todas as referidas lavagens, sendo possível visualizar o polipéptido Blad com aproximadamente 20 kDa. Ao comparar os perfis eletroforéticos das ‘lanes’ 1 e 8 é possível verificar que são semelhantes à exceção da presença adicional do polipéptido Blad no perfil eletroforético da ‘lane’ 8, permitindo concluir que o polipéptido Blad se ligou na realidade às proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. Em conclusão, este ensaio permitiu inferir a existência de pelo menos uma interação intermolecular, possivelmente de natureza polar, entre o polipéptido Blad e as glicanas das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* pelas quais possui afinidade.

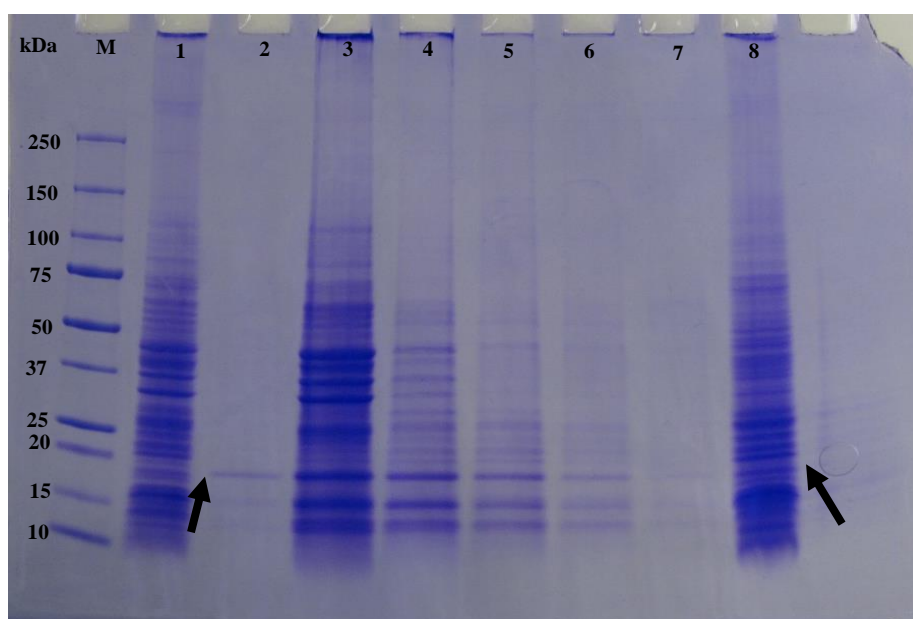


Figura 7. SDS-PAGE referente ao ensaio da incubação das membranas plasmáticas de *C. albicans*, contendo as proteínas desta, incubadas com Blad [1] Fracção proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* (50 µg); [2] Blad purificada (50 µg); Tampão de lavagem após incubação das membranas de *C. albicans* com o polipéptido Blad: [3] 1ª lavagem (100 µL); [4] 2ª lavagem (100 µL); [5] 3ª lavagem (100 µL); [6] 4ª lavagem (100 µL); [7] 5ª lavagem (100 µL); [8] Fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* após incubação com Blad e após as lavagens (50 µg); [M] Marcador *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (kDa). As setas indicam no gel a localização do polipéptido Blad.

III.3. Ensaios de imunodeteção do polipéptido Blad

III.3.1. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total proteica da membrana plasmática de *C. albicans*

Após a separação eletroforética por SDS-PAGE das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, estas foram eletrotransferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Deste modo foi possível proceder à imunodeteção do polipéptido Blad que se ligou às proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. Este ensaio consistiu em incubar a membrana de nitrocelulose, já com as glicoproteínas transferidas para esta, com uma solução contendo o polipéptido Blad, procedendo-se de seguida à imunodeteção utilizando como anticorpo primário o anticorpo anti-Blad produzido em coelho e como anticorpo secundário um anti-coelho produzido em cabra conjugado com a fosfatase alcalina que proporciona a revelação do sinal quimioluminescente representado por cinzento/preto na Figura 8, que teoricamente é indicativo de quais as proteínas o polipéptido Blad se ligou.

Na Figura 8 são visíveis duas bandas na região dos 25 kDa, duas bandas na região dos 37 kDa, e quatro bandas visíveis a 75, 20, 15 e 10 kDa (indicadas por setas na figura). A mancha preta na região dos 100 kDa para cima poderá dever-se a qualquer tipo de contaminação, pois em mais nenhum teste de imunodeteção do polipéptido Blad nas proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* foram detetadas bandas nesta região, pondo-se então as hipóteses de esta mancha se ter originado devido ao anticorpo de coelho ser policlonal, a contaminantes ou a outros fatores físico-químicos desconhecidos.

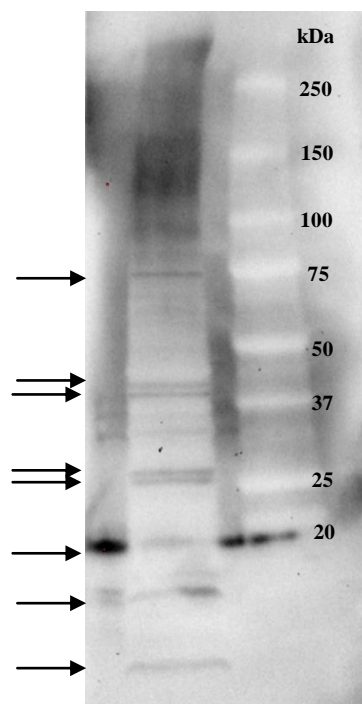


Figura 8. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total proteica da membrana plasmática de *C. albicans* (50 µg). As setas indicam a localização das potenciais proteínas onde o polipéptido Blad se ligou.

III.3.2. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* sujeita a diferentes níveis de desglicosilação

De modo a obter informação sobre a natureza da ligação entre o polipéptido Blad e as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, após terem sido eletroforéticamente separadas por SDS-PAGE e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose, estas foram sujeitas a dois níveis de desglicosilação com ácido periódico, parcial e total, antes da incubação com o polipéptido Blad. De seguida incubou-se a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas com uma solução contendo o polipéptido Blad, com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho e finalmente com o anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina, o que após a incubação com o seu substrato quimioluminescente, luminol, permitiu a deteção do sinal representado por cinzento/preto na Figura 9. Teoricamente a emissão de quimioluminescência permite identificar as proteínas que se

ligaram ao polipéptido Blad. Da observação da Figura 9 verificamos que a banda de 10 kDa só é visível no ensaio sem desglicosilação (B) e não nos outros dois ensaios que envolvem desglicosilação parcial (A) e total (C). Este resultado permite concluir que são as glicanas da glicoproteína de 10 kDa as únicas responsáveis pela ligação intermolecular da Blad à glicoproteína. A banda com 25 kDa é detectável nas três situações. É visível outra banda com aproximadamente 37 kDa nos três tratamentos (A,B,C), mas devido à sua visualização ser muito fraca, sendo no entanto mais forte em (A) e (B), torna difícil a análise da natureza da ligação do polipéptido Blad a esta proteína.

Este ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, sujeitas a diferentes níveis de desglicosilação, representado na Figura 9, permitiu inferir que as glicanas das glicoproteínas deverão ter um papel importante na ligação do polipéptido Blad às glicoproteínas da membrana plasmática de *C. albicans*.

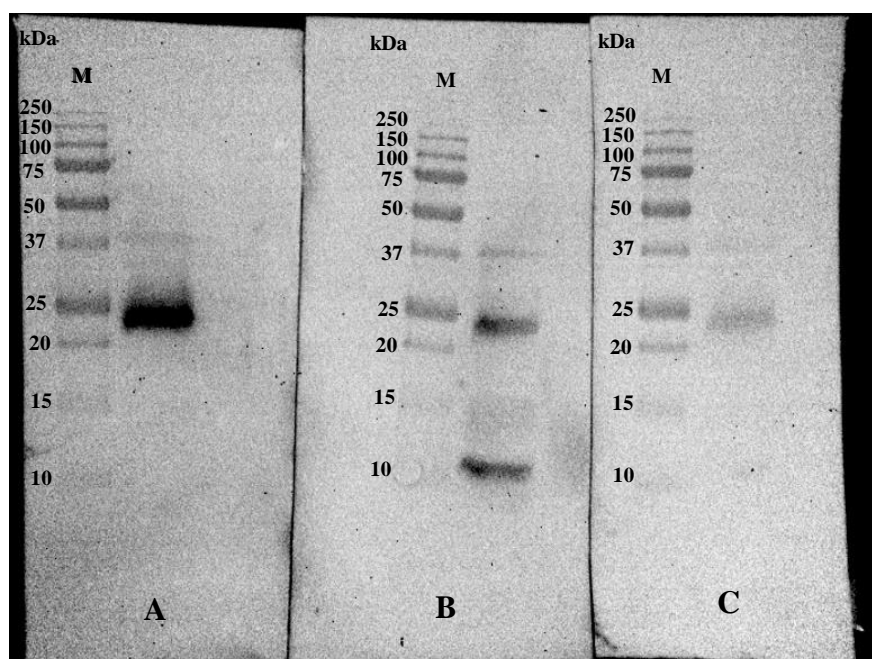


Figura 9. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. [A] desglicosilação parcial das glicoproteínas (12,5 mM de ácido periódico durante 2 horas) (50 µg). [B] sem desglicosilação das glicoproteínas (50 µg). [C] desglicosilação total das glicoproteínas (100 mM de ácido periódico durante 1 hora) (50 µg).

III.3.3. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total proteica da membrana plasmática de *C. albicans* sujeita a diferentes pH's, após incubação com o polipéptido Blad

Procedeu-se a um novo ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad de modo a obter mais informação sobre a natureza da sua ligação com as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. Este ensaio, cujos resultados se encontram representados na Figura 10, consistiu em expor a fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* previamente separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE, e eletrotransferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com Blad, a diferentes pH's numa solução de acetato de sódio. Em seguida incubou-se com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho e finalmente com o anticorpo secundário conjugado com a fosfatase alcalina, o que proporcionou a revelação do sinal quimioluminescente representado por cinzento/preto na Figura 10, e que, teoricamente é identifica as proteínas que se encontram ligadas ao polipéptido Blad. O facto das duas bandas com massa molecular aproximada de 37 kDa e 50 kDa não serem visíveis quando as proteínas da membrana plasmática, previamente incubadas com o polipéptido Blad, foram expostas a um pH de 3 (Figura 10C), demonstra a natureza polar da interação intermolecular entre o polipéptido Blad e estas duas proteínas. A visualização da banda com 20 kDa com a mesma intensidade nos 3 ensaios, permite inferir que a ligação intermolecular entre o polipéptido Blad e a proteína desta banda não depende do pH, pelo menos na gama de pH em que foi realizado este ensaio, de 3 a 7,5. Uma possibilidade bastante plausível, atendendo a este facto e à inexistente ou fraca dependência do pH numa interação hidrofóbica, é a de que o polipéptido Blad poderá estar envolvido numa interação hidrofóbica com a proteína na banda a 20 kDa, não sendo excluída a hipótese de ao mesmo tempo estar também envolvida numa interação intermolecular polar proteína-açúcar.

Através da análise da Figura 10 é possível inferir que as proteínas presentes nas bandas com massa molecular aproximada de 37 kDa e 50 kDa deverão participar numa interação intermolecular com natureza polar, enquanto que a proteína na banda de 20 kDa parece participar pelo menos numa ligação hidrofóbica com o polipéptido Blad.

A banda visível com 20 kDa nos ensaios de imunodeteção (A), (B), (C) representados na Figura 10, corresponde, possivelmente, à banda visível a 20 kDa no

ensaio de imunodeteção descrito no capítulo III.3.1 cujos resultados se encontram apresentados na Figura 8. A banda visível com massa molecular aproximada de 37 kDa nos ensaios de imunodeteção (A), (B) correspondem possivelmente a uma das duas bandas visíveis com 37 kDa no ensaio de imunodeteção descrito no capítulo III.3.1 com os resultados descritos na Figura 8. Apesar das duas bandas com 25 kDa terem sido curiosamente as duas bandas visualizadas nos ensaios de imunodeteção descritos nos capítulos III.3.1 e III.3.2, não foram imunodetetadas neste ensaio, verificando-se neste caso uma inconsistência com a relação entre estes dados.

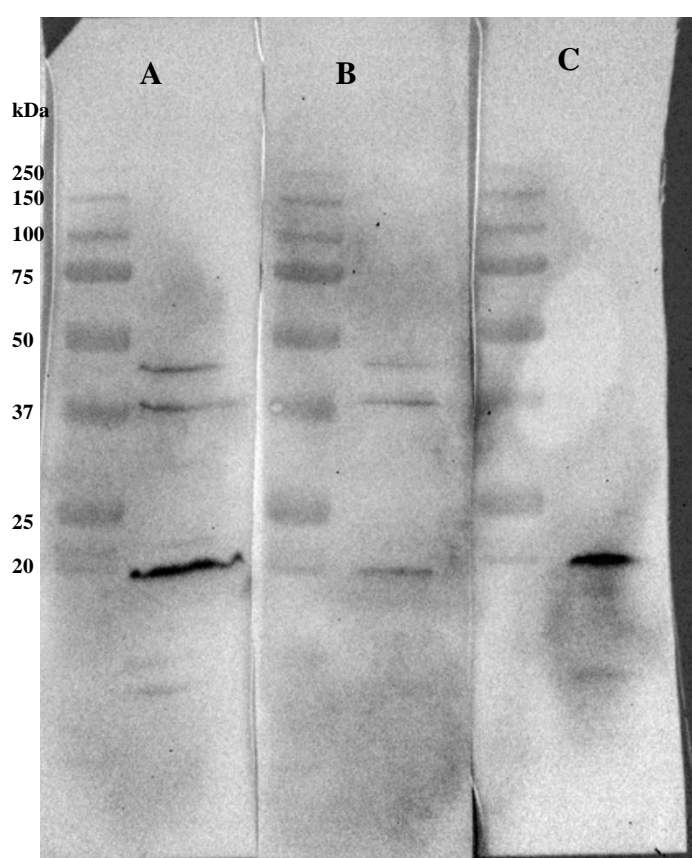


Figura 10. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad após incubação com a fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* (50 µg) e exposição das membranas a diferentes pH's numa solução de acetato de sódio: (A): pH 7,5; (B): 5; (C): 3.

III.4. Eletroforese bidimensional das proteínas totais da membrana plasmática de *C. albicans*

De modo a possibilitar a sequenciação e identificação das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad e analisar as suas glicanas, recorreu-se à separação eletroforética bidimensional das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. A resolução da separação de proteínas por eletroforese bidimensional é muito superior à da separação por SDS-PAGE unidimensional, pois apesar de as proteínas serem também separadas por massa molecular são previamente separadas pelo seu ponto isoeletrico, permitindo, portanto, admitir que cada ‘spot’ corresponde a uma proteína. No decorrer deste trabalho, a maior parte das focagens isoeletricas efetuadas não foram bem-sucedidas, pois o equipamento de focagem isoeletrica disponível não se encontrava a funcionar corretamente e devido ao fato de grande parte das proteínas de membrana plasmática possuir elevada hidrofobicidade, não sendo esta uma característica que favoreça uma boa focagem isoeletrica.

Em estudos proteómicos, as proteínas membranares são mais difíceis de analisar do que as proteínas solúveis e portanto constituem apenas uma pequena porção dos dados/identificação adquiridos das proteínas [155]. As estratégias convencionais para estudar proteínas membranares à escala proteómica costumam começar por separar as proteínas membranares utilizando eletroforese bidimensional, embora com esta técnica não se obtenha uma boa resolução das proteínas, maioritariamente devido a problemas com a sua solubilização [156], e a sua natureza hidrofóbica, que faz as proteínas membranares suscetíveis á precipitação durante a focagem isoeletrica [157]. Muitas proteínas membranares também possuem pI's básicos, o que limita ainda mais a sua separação em géis 2-D [158], sendo ainda agravado baixa abundância relativa de algumas proteínas individuais na membrana. Para ultrapassar estas limitações em estudos proteómicos de proteínas membranares, diferentes estratégias foram implementadas no enriquecimento, separação, e digestão [26], sendo que algumas destas técnicas se baseiam em fracionamento subcelular e plataformas proteómicas ‘gel-free’.

Na Figura 11 está representada o perfil eletroforético bidimensional das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* que foi eletrotransferido do gel de poli(acrilamida para uma membrana de nitrocelulose. Parecem estar ausentes algumas proteínas no perfil

eletroforético representado na Figura 11, pois o perfil eletroforético bidimensional das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* representado em [95], permite visualizar um maior número de proteínas. É também visível um efeito de arrastamento das proteínas em algumas regiões da membrana de nitrocelulose. Estas observações sugerem que a eletroforese bidimensional não decorreu na perfeição, pois seria unicamente de esperar a presença de ‘spots’ bem definidos e isolados, representando estes uma única proteína.

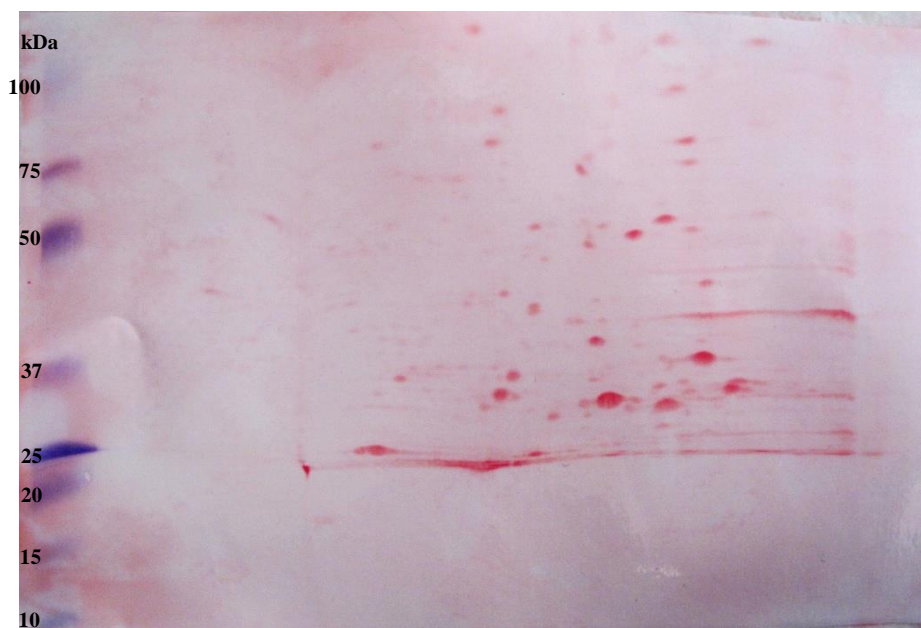


Figura 11. Perfil das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* separadas por eletroforese bidimensional (200 µg)

III.5. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total proteica da membrana plasmática de *C. albicans*, com as proteínas previamente separadas por eletroforese bidimensional

No ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado às proteínas totais da membrana plasmática de *C. albicans*, que é representado na Figura 12, é possível observar um ‘spot’ bem visível com massa aproximada de 10 kDa e outros dois spots menos visíveis, e inclusive duvidosos (background) na região da massa molecular de 25-37 kDa (é difícil determinar com exatidão a massa molecular destes spots uma vez que o marcador molecular se encontra pouco visível e com alguma distorção). Estes ‘spots’ correspondem

a proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* que possuem afinidade ao polipéptido Blad.

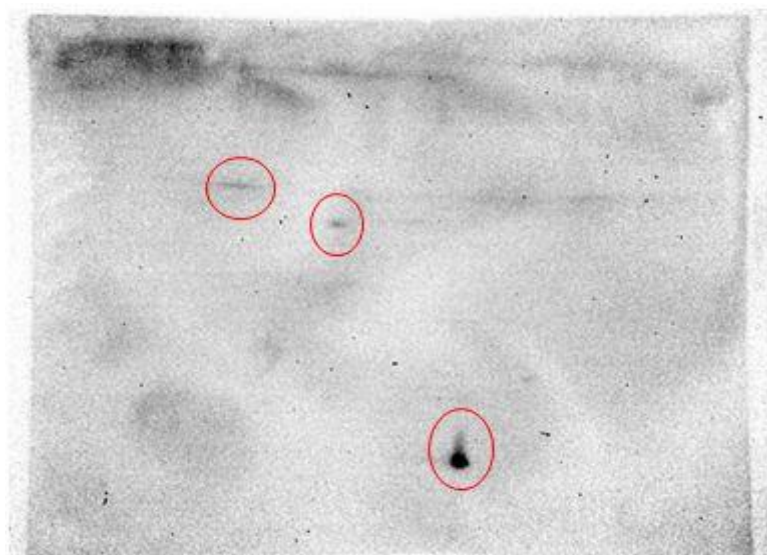


Figura 12. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligada às proteínas totais da membrana plasmática de *C. albicans*, previamente separadas eletroforese bidimensional (200 µg).

No ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad nas proteínas totais da membrana plasmática de *C. albicans*, que é representado na Figura 13, é possível observar um ‘spot’ bem visível na região de massa molecular de 10 kDa. Este ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad permitiu concluir que após desglicosilação total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* o polipéptido Blad continuou a ligar-se a uma destas, pondo-se a hipótese de o polipéptido Blad participar numa ligação hidrofóbica com esta proteína da membrana plasmática de *C. albicans* pela qual possui afinidade.

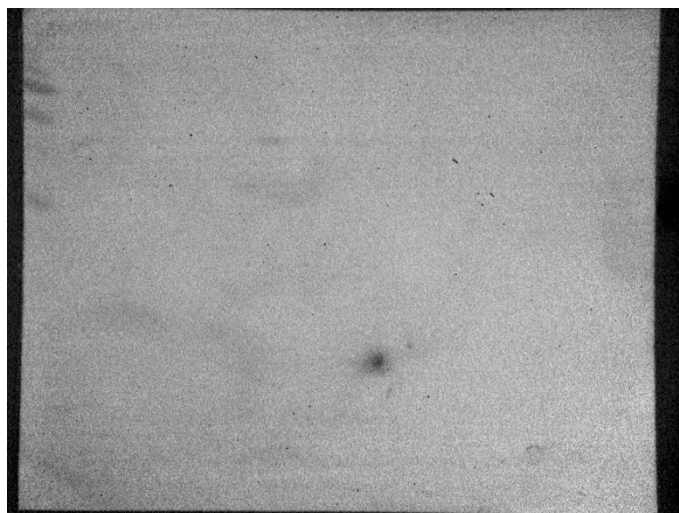


Figura 13. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad ligado à fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* após terem sido submetidas ao processo de desglicosilação total (100 mM de ácido periódico durante 2 horas), separadas por eletroforese bidimensional (200 µg).

III.6. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad através da sua co-imunoprecipitação com o polipéptido Blad

Com o objetivo de isolar as proteínas com afinidade/ligação ao polipéptido Blad para sua posterior sequenciação por MS e determinação das suas glicanas por diversos métodos, recorreu-se à imunoprecipitação da fração total das proteínas previamente extraídas das membranas plasmáticas de *C. albicans*, utilizando ‘beads’ magnéticas. Na Figura 14, a ‘lane’ 1 representa o perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* previamente incubada com o polipéptido Blad, sendo possível a sua visualização na zona correspondente aos 20 kDa com uma cor laranja característica aquando da sua coloração com nitrato de prata. Na ‘lane’ 2 encontra-se o perfil eletroforético do anticorpo anti-Blad produzido em coelho. Na ‘lane’ 3 encontra-se a fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* após incubação com Blad e com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho. Após a incubação das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com o polipéptido Blad e com anticorpo anti-Blad produzido em coelho, incubou-se esta mistura com ‘beads’ magnéticas que possuem ligadas covalentemente à sua superfície as proteínas A e G, que são antígenos para as

imunoglobulinas G. desta incubação resultou a formação de um complexo multimolecular: proteínas com afinidade ao polipéptido Blad — polipéptido Blad — anticorpo anti-Blad — proteínas A e G — beads magnéticas.

Após um processo de lavagens e eluição isolaram-se duas proteínas com afinidade ao polipéptido Blad, representadas por A e B na Figura 10 na ‘lane’ 4. No entanto, não se põe de parte a hipótese de cada uma destas duas bandas ser na realidade um conjunto de proteínas sobrepostas que não se conseguiram separar e visualizar individualmente devido à sua má resolução no gel de acrilamida.

Na Figura 14 observa-se a fração contendo as proteínas de membrana A e B, que se ligaram ao polipéptido Blad e consequentemente ao anticorpo deste, tendo sido extraídas magneticamente.

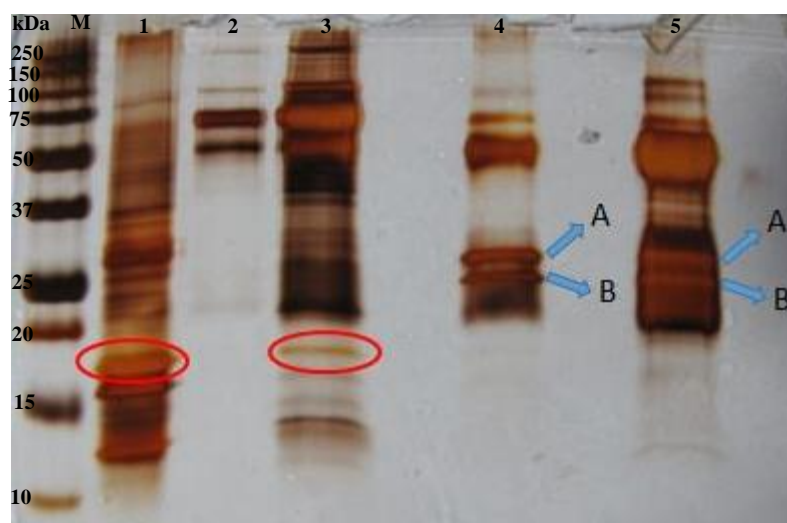


Figura 14. Análise por SDS-PAGE das proteínas totais da membrana plasmática de *C. albicans* incubadas com Blad. [1] Fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* incubada com Blad (10 µg); [2] Anticorpo de coelho (5 µg); [3] Fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* após incubação com Blad e com o anticorpo de coelho/sobrenadante (10 µg); [4] Primeira eluição com tampão (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) (10 µg); [5] Segunda eluição com tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol (10 µg); [A] Proteína com afinidade ao polipéptido Blad; [B] Proteína com afinidade ao polipéptido Blad; [M] Marcador *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (kDa). Gel de acrilamida de 17,5%, corrido a 150 V.

Devido à ausência do polipéptido Blad na fração eluída com tampão (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) e à presença de bandas correspondentes ao anticorpo na região dos 50 kDa, como é possível observar na ‘lane’ 4, permite inferir que as partes do complexo multimolecular eluídas foram somente as bandas de anticorpo e as proteínas A e B com afinidade ao polipéptido Blad. O polipéptido Blad manteve-se ligado ao anticorpo de coelho anti-Blad que se encontra ligado às ‘beads’ magnéticas, enquanto que as proteínas da membrana plasmática que também possuía ligadas a si, foram eluídas no tampão de eluição. Não se conseguem observar a banda do polipéptido Blad em nenhuma das duas diferentes eluições. Na eluição com tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol (‘lane’ 5) estão também presentes as bandas das proteínas A e B, juntamente com bandas do anticorpo, não pondo de parte a hipótese de estarem presentes outras bandas de proteínas da membrana plasmática que possuem afinidade ao polipéptido Blad.

As duas proteínas visíveis na região dos 25 Kda parecem ser as mesmas duas proteínas imunodetetadas no primeiro ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad nas proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, que é representado na Figura 8, no capítulo III.3.1, onde se visualizam duas proteínas nesta mesma região de 25 kDa.

Foi realizado mais um ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad, que está representado na Figura 15, de forma a confirmar a sua afinidade de ligação às proteínas A e B.

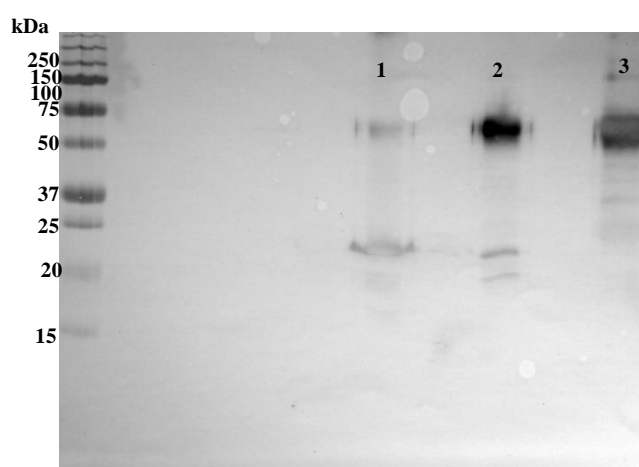


Figura 15. Ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad nas amostras de: (1) Sobrenadante após incubação da fração total das proteínas previamente extraídas da membrana plasmática de *C. albicans* com o anticorpo anti-Blad produzido em coelho e com as

‘beads’ magnéticas (50 µg); (2) Primeira eluição com tampão (0,2% (m/v) SDS, 0,1% (v/v) Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) (quantidade de proteína presente no total do volume eluído); (3) Segunda eluição com tampão de eluição (1% (m/v) SDS, 50% glicerol (quantidade de proteína presente no total do volume eluído)).

Na Figura 15 na ‘lane’ 1 está representado o sobrenadante que resultou da incubação das proteínas extraídas da membrana plasmática de *C. albicans* com o polipéptido Blad, com o seu anticorpo anti-Blad produzido em coelho e com as ‘beads’ magnéticas, sendo possível visualizar apenas uma fração das bandas do anticorpo policlonal anti-Blad que permaneceram em solução. No sobrenadante ficaram em solução todas as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* sem afinidade ao polipéptido Blad, juntamente com o excesso de anticorpo policlonal anti-Blad. Na ‘lane’ 2 é possível visualizar as proteínas com afinidade de ligação ao polipéptido Blad, entre os 20 e 25 kDa, assim como a banda maioritária do anticorpo policlonal anti-Blad na região dos 75 kDa. Na ‘lane’ 3 é visualizada a banda maioritária do anticorpo policlonal anti-Blad na região dos 75 kDa e 3 bandas na região dos 37 a 50 kDa, podendo estas serem outras proteínas com afinidade ao polipéptido Blad ou/e a outras bandas do anticorpo anti-Blad. No entanto, pelo menos a banda a 37 kDa na ‘lane’ 3 parecia possuir alta probabilidade de ser uma proteína com afinidade ao polipéptido Blad, pois encontra-se presente nos outros ensaios de imunodeteção realizados.

III.7. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad, com o objetivo de posterior sequenciação por MS

Procedeu-se a nova imunoprecipitação de modo a promover o isolamento das proteínas A e B tal como descrito no capítulo II na secção 13, de forma a que estas pudessem ser reveladas pela sua coloração com Coomassie G-250 no gel de poliácridamida, por ser este o corante mais compatível na análise de MS de proteínas. Este procedimento consistiu na excisão das proteínas A e B para a sua posterior análise por MS, com o objetivo de proceder à sua identificação.

III.8. Identificação por espectrometria de massa das duas bandas, as quais se assumiu conterem as proteínas com afinidade ao polipéptido Blad, isoladas por imunoprecipitação.

A(s) proteína(s) presentes nas duas bandas que foram excisadas do gel de poliacrilamida referente ao procedimento de imunoprecipitação (capítulo III.7), resultaram na identificação por espectrometria de massa da cadeia kappa-b4 da imunoglobulina de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Esta identificação desta proteína nas duas bandas foi uma surpresa, pois tinha sido assumido antes da análise por espectrometria de massa que as proteínas presentes nestas duas bandas seriam as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade ao polipéptido Blad.

III.9. Isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad através de correspondência entre as bandas nas quais o polipéptido Blad foi imunodetado e as bandas de idêntica massa molecular presentes no perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*

Correu-se um gel de SDS-PAGE no qual foram inseridas em duas ‘lanes’ adjacentes 100 µg das proteínas extraídas da membrana plasmática de *C. albicans*. Procedeu-se ao corte do gel de poliacrilamida entre as 2 ‘lanes’ adjacentes, sendo que uma das ‘lanes’ foi corada com Coomassie G-250 e a outra ‘lane’ foi utilizada no ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad.

Tendo como referência o mesmo marcador molecular tanto no SDS-PAGE (Figura (A)) como na imunodeteção (Figura (B)), tentou-se fazer a correspondência visual das bandas detetadas no ensaio de imunodeteção com as respetivas bandas de massa molecular idêntica no gel de poliacrilamida (indicadas pelas setas na Figura 16). Procedeu-se à excisão destas bandas (massas moleculares aproximadas de: 50 kDa, 37 kDa (2 bandas) e

20 Kda) no gel de poliacrilamida corado com Coomassie G-250, para que posteriormente fossem analisadas por espectrometria de massa.

Este procedimento de isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad foi executado como alternativa ao procedimento de co-imunoprecipitação do polipéptido Blad juntamente com as proteínas com afinidade a este. Devido à análise de espectrometria de massa das bandas eluídas no procedimento de co-imunoprecipitação ter resultado na identificação de anticorpo, não sendo este resultado esperado pois esperava-se que estas bandas corresponderiam às proteínas isoladas com afinidade ao polipéptido Blad. No entanto, este novo procedimento de isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad, alternativo à co-imunoprecipitação, possui elevada probabilidade de originar falsos-positivos. Esta possível situação deve-se à impossibilidade de determinar com certeza quais as bandas correspondentes no gel de poliacrilamida às bandas no qual o polipéptido Blad é imunodetetado, pois basicamente o método utilizado foi a correspondência (humana) visual.

Devido ao elevado número de proteínas presente na fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans*, a sua separação no gel de poliacrilamida não possui muita resolução. Poderão existir também proteínas de elevada semelhança em relação à sua massa molecular que poderão estar presentes na mesma banda. Estes dois fatores são responsáveis pela elevada probabilidade deste procedimento de isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad originar falsos-positivos.

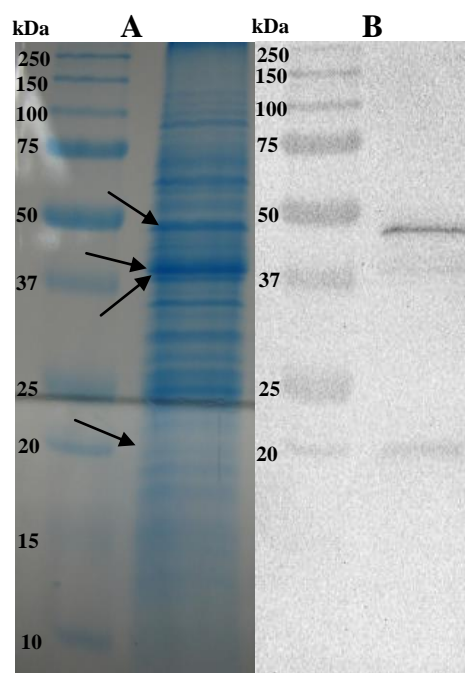


Figura 16. (A) SDS-PAGE da fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans* (100 µg) (B) Imunodeteção do polipéptido Blad na fração proteica total da membrana plasmática de *C. albicans*. As setas indicam quais as bandas excisadas no gel (A) que possuem massa molecular idêntica às bandas nas quais o polipéptido Blad foi imunodetetado (B), para que a(s) proteína(s) presentes nessas bandas do gel pudessem ser posteriormente analisadas por espectrometria de massa.

III.10. Identificação por espectrometria de massa das proteínas, isoladas através de correspondência, com afinidade ao polipéptido Blad

Foram identificadas através de espectrometria de massa a(s) proteína(s) presentes nas bandas excisadas do gel de poliácridamida referente ao procedimento de isolamento das proteínas com afinidade ao polipéptido Blad. Esta identificação foi feita através de correspondência entre as bandas nas quais o polipéptido Blad foi imunodetado e as bandas de idêntica massa molecular presentes no perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*. (capítulo III.9)

- Banda de massa molecular aproximada de 50 kDa:

Foi identificada a subunidade beta da ATP sintetase mitocondrial do organismo *Kluyveromyces lactis* (estirpe ATCC 8585 / CBS 2359 / DSM) com o nome de acesso ATPB_KLULA da Uniprot. A identificação desta proteína foi aceite com um grau de confiança de 100% dos dados de MS e um grau de confiança de 100% e 75% dos dados de MS/MS (foram analisados por MS/MS 2 péptidos desta proteína com as sequências FLSQPFVAEVEFTGIPGR e VALTGLTIAEYFRDEEGQDVLLFIDNIFR, respetivamente).

Inseriu-se no motor de busca da STRING o nome de acesso da Uniprot, ATPB_KLULA, sendo que resultou na identificação do gene ATP2 que codifica para a proteína com o número de acesso P49376 na Uniprot, pertencente ao organismo *Kluyveromyces lactis*. Fez-se uma pesquisa de proteínas/genes similares no organismo *Candida albicans*, sendo que o resultado de similaridade foi a proteína/gene (ATP2). De seguida inseriu-se no motor de busca da Uniprot o código CAL0000663 da Candida Genome Database, da proteína correspondente ao gene ATP2 de *C. albicans*. O código do gene que codifica para a subunidade beta da ATP sintetase mitocondrial de *C. albicans*, segundo a Candida Genome Database, é ATP2.

O gene ATP2 codifica a subunidade beta F_1 da ATP sintetase do complexo mitocondrial F_1F_o . A subunidade beta F_1 da ATP sintetase contribui para a atividade de transporte de prótons da ATP sintetase.

A subunidade beta da ATP sintetase foi identificada associada à membrana plasmática de *C. albicans* [57,59] sendo que num estudo por Hernaez ML et.al [159] onde se identificaram proteínas expostas à superfície das células de *C. albicans*, através de um protocolo que impossibilitou a contaminação com proteínas intracelulares, a subunidade beta da ATP sintetase foi identificada como uma proteína presente na parede celular.

Apesar da função da subunidade beta da ATP sintetase ser desconhecida quando presente na parede celular e/ou quando presente na superfície da célula associada à membrana plasmática, a sua função, seja ela qual for, nestas duas localizações extracelulares, deverá ser importante para o normal funcionamento das células de *C. albicans*. Visto que o polipéptido Blad liga à subunidade beta da ATP sintetase (inferido pelo ensaio de imunodeteção no capítulo III.9), põe-se a possibilidade de inativar/inibir

esta proteína de algum modo, o que muito provavelmente provoca alterações no normal funcionamento das células de *C. albicans*, podendo deste modo levar à sua morte.

As anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ATP2 de *C. albicans* foram consultadas na Candida Genome Database e encontram-se descritas no anexo I.

- Banda de massa molecular aproximada de 37 kDa:

Nesta banda foram identificadas por espectrometria de massa duas proteínas diferentes:

1- Foi identificada a enolase 1 do organismo *Candida albicans* (estirpe SC5314 / ATCC MYA-2876) com o nome de acesso da Uniprot, ENO1_CANAL. A identificação desta proteína foi aceite com um grau de confiança do MS/MS de 97,2% e de 41,7% (foram analisados por MS/MS 2 péptidos desta proteína com as sequências SGETEDTFIADLSVGLR e VNQIGTLTESIQAANDSYAAGWGMVSHR, respetivamente).

A enolase (2-fosfo-D-glicerato hidrolase) é uma enzima chave na glicólise, responsável pela desidratação do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, e pela reação inversa na gluconeogénese [160]. A enolase é uma proteína citoplasmática abundante em *C. albicans*, sendo que é também encontrada associada com glucana(s) nas camadas internas da parede celular, onde a sua função é pouco clara [161]. A enolase 1 foi também identificada e associada à parede celular [159]. Em leveduras a enolase tem potencial para interagir com a membrana plasmática [59,162], nomeadamente com fosfolípidos [163]. O mecanismo de secreção que envolve o transporte da enolase e de outras proteínas citoplasmáticas para a superfície da célula é desconhecido [162]. Não foi encontrada na bibliografia qualquer referência em relação à (possível) glicosilação da enzima enolase.

Apesar da função da enolase 1 (Eno1) ser pouco clara quando presente na parede celular ou quando presente na superfície da célula associada à membrana plasmática, a sua função, seja ela qual for, nestas duas localizações extracelulares, deverá ser importante para o normal funcionamento das células de *C. albicans*. Visto que o polipéptido Blad liga à enolase 1 (inferido pelo ensaio de imunodeteção no capítulo III.9), põe-se a possibilidade

de inativar/inibir esta enzima de algum modo, o que muito provavelmente provoca alterações no normal funcionamento das células de *C. albicans*, podendo deste modo levar à sua morte.

As anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ENO1 de *C. albicans* foram consultadas na Candida Genome Database e encontram-se descritas no anexo I.

2- Na mesma banda de 37 kDa na qual se identificou a enolase 1 foi identificada a álcool desidrogenase 1 do organismo *Candida albicans* (estirpe SC5314 / ATCC MYA-2876) com o nome de acesso da Uniprot, ADH1_CANAX. A identificação desta proteína foi aceite com um grau de confiança de 99,6% do MS/MS (foi analisado por MS/MS um péptido desta proteína com a sequência TADLAAGQWVAISGAGGGLGSLAVQYAR)

A álcool desidrogenase (ADH) é uma enzima que catalisa a redução do acetaldeído em etanol com formação de NAD^+ . A álcool desidrogenase foi identificada e associada à parede celular [159] A presença da álcool desidrogenase (ADH) na parede celular de *C. albicans* foi sugerida [164], tendo sido sugerido também que funciona como recetor da fibronectina. No seu conjunto, a localização de presumivelmente enzimas “intracelulares” glicolíticas na parede celular de *C. albicans* é bastante intrigante, assim como os possíveis papéis celulares em que estas moléculas poderão participar (e.g., papel energético, antigenicidade, recetores de superfície), e também os mecanismos envolvidos na sua secreção. Contudo, a presença de enzimas glicolíticas em superfícies microbianas não é inédito [165].

A álcool desidrogenase 1 (Adh1) de *C. albicans* foi identificada por Castillo et al. [59] como sendo uma proteína associada à membrana plasmática.

Apesar da função da Adh1 ser pouco clara quando presente na parede celular ou quando presente na superfície da célula associada à membrana plasmática, a sua função, nestas duas localizações extracelulares, deverá ser importante para o normal funcionamento das células de *C. albicans*. Visto que o polipéptido Blad liga à Adh1, (inferido pelo ensaio de imunodeteção no capítulo III.9) põe-se a possibilidade de inativar/inibir esta enzima de algum modo, o que muito provavelmente provoca alterações no normal funcionamento das células de *C. albicans*, podendo deste modo levar à sua morte.

As anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ADH1 de *C. albicans* foram consultadas na Candida Genome Database e encontram-se descritas no anexo I.

- Banda de massa molecular aproximada de 37 kDa (2):

Foi identificada a proteína putativa sulfonato dioxigenase alfa-cetoglutarato dependente do organismo *Schizosaccharomyces pombe* (estirpe 9) com o nome de acesso da Uniprot, YP54_SCHPO. A identificação desta proteína foi aceite com um grau de confiança de 92% dos dados de MS.

A sequência de aminoácidos da proteína de *S. pombe* foi acedida através da inserção do nome de acesso YP54_SCHPO no motor de busca da Uniprot.

Fez-se a pesquisa de proteínas de *C. albicans* homólogas em sequência de aminoácidos à sequência de aminoácidos da proteína ‘Putative alpha-ketoglutarate-dependent sulfonate dioxygenase’ de *Schizosaccharomyces pombe* no motor de busca da STRING. O resultado da proteína homóloga de *C. albicans* com maior ‘score’ foi escolhido, ou seja a proteína que o gene TCD2 de *C. albicans* codifica. Esta proteína de *C. albicans*, é uma proteína prevista, pois ainda não foi detetada nem sequenciada.

A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene TCD2 de *C. albicans* em relação à sua função molecular indica: atividade de oxidoreductase (inferido por computação). A anotação de GO do gene TCD2 de *C. albicans* em relação ao seu processo biológico indica: processo de oxidação-redução (inferido por computação). A anotação de GO do gene TCD2 de *C. albicans* em relação à sua localização na célula indica: desconhecido (determinado de modo manual – manually curated). A informação sobre a GO do gene TCD2 de *C. albicans* foi acedida no ‘site’ da ‘Candida Genome Database’.

As anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene TCD2 de *C. albicans* foram consultadas na Candida Genome Database e encontram-se descritas também no anexo I.

Não foi identificada por espectrometria de massa nenhuma proteína na banda de massa molecular de 20 kDa.

III.11. Bioinformática

III.11.1. Ferramenta bioinformática Phyre

A ferramenta bioinformática Phyre fornece a informação sumária da confiança na modelação tridimensional da proteína em questão. Esta apresentou a informação de que 100 % dos resíduos de aminoácidos do polipéptido Blad (Figura 17) foram modelados com > 90% de precisão.

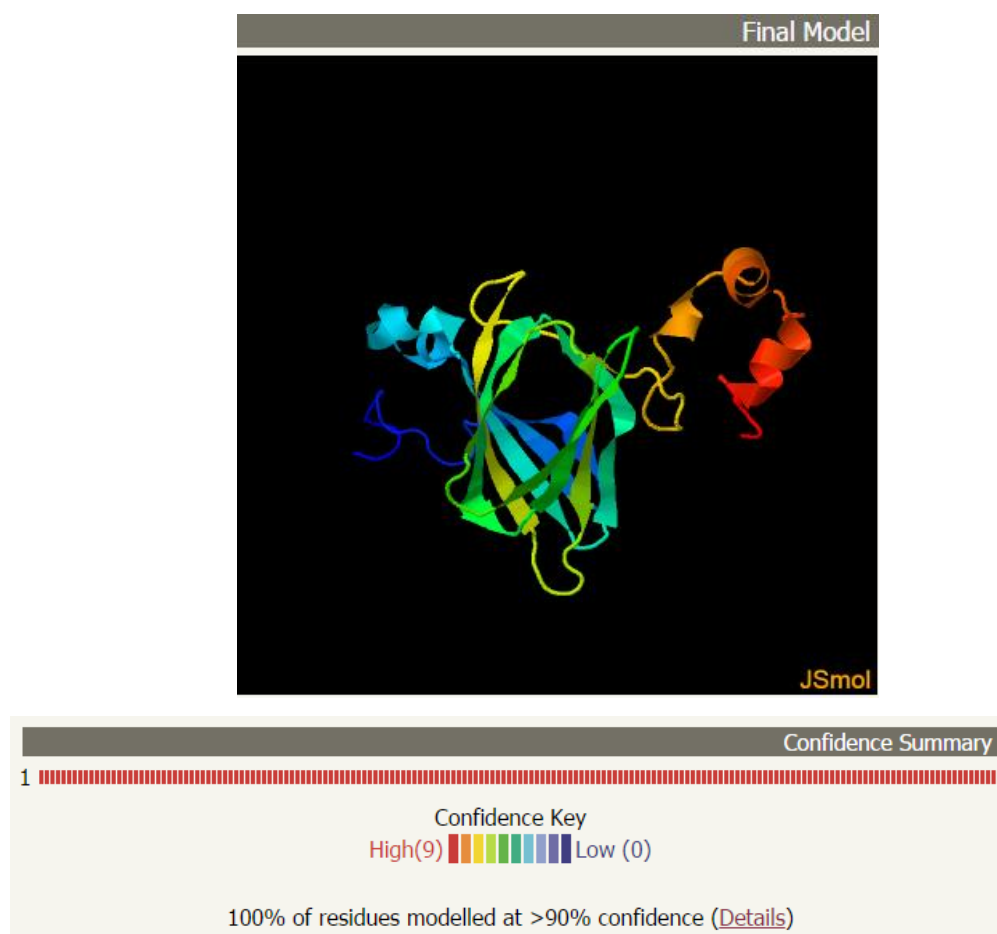


Figura 17- Representação do modelo final da previsão da estrutura tridimensional do polipéptido Blad mostrando a extensão da sua cadeia proteica em cores de arco-íris (rainbow) na direção terminal N para terminal C. Representa-se também o sumário de confiança da modelação tridimensional do polipéptido Blad.

As 6 proteínas (Figura 18) com maior homologia estrutural ao polipéptido Blad foram seleccionadas para a modelação da estrutura tridimensional do polipéptido Blad,

baseado em heurísticas (processos computacionais heurísticos (algoritmos)) de forma a maximizar a confiança na previsão de estrutura, a percentagem de identidade e a cobertura do alinhamento. Em baixo encontra-se uma tabela que indica em que zona da sequência das proteínas homólogas ao polipéptido Blad, a sequência do polipéptido Blad foi coberta/correspondida.

| Template | Confidence | 1 |
|-------------------------|------------|-----|
| c2eaaB | 100% | |
| d1uika1 | 100% | |
| d1dgwa | 100% | |
| c1uijA | 100% | |
| c3s7eB | 100% | |
| d1uija1 | 100% | |
| Template | Confidence | 101 |
| c2eaaB | 100% | |
| d1uika1 | 100% | |
| d1dgwa | 100% | |
| c1uijA | 100% | |
| c3s7eB | 100% | |
| d1uija1 | 100% | |

Figura 18- Indicação sobre a zona da sequência das proteínas homólogas ao polipéptido Blad, a sequência do polipéptido Blad foi coberta/correspondida. Indica também a % de confiança da modelação tridimensional do polipéptido Blad em relação a cada uma das 6 proteínas homólogas a este.

O Phyre encontrou 120 proteínas estruturalmente homólogas ao polipéptido Blad, com diferentes graus de homologia (dados não mostrados). Estas 120 proteínas homólogas ao polipéptido Blad foram pesquisadas na STRING com o objetivo de encontrar interações proteína-proteína com proteínas de *C. albicans*.

III.11.2. Ferramenta bioinformática 3DLigandSite

A ferramenta bioinformática 3DLigandSite realizou a previsão de locais de ligação da estrutura tridimensional prevista do polipéptido Blad, que foi realizada pelo Phyre, assim como a previsão de ligandos que ligam a esses locais de ligação.

Em baixo apresenta-se a tabela com os diferentes ‘clusters’ de ligandos, que foram utilizados para a previsão dos respetivos locais de ligação da estrutura tridimensional prevista do polipéptido Blad.

Tabela 2 - Detalhes dos ‘clusters’ de ligandos identificados no modelo estrutural tridimensional do polipéptido Blad.

| Cluster | Ligandos | Estruturas | Scores MAMMOTH (-lnE) | | |
|---------|----------|------------|-----------------------|--------|--------|
| | | | Média | Mínimo | Máximo |
| 1 | 13 | 3 | 16.4 | 15.5 | 18.1 |
| 2 | 2 | 2 | 12.4 | 12.2 | 12.6 |
| 3 | 1 | 1 | 20.1 | 20.1 | 20.1 |

Tabela de locais de ligação previstos

Os resíduos de aminoácidos que foram previstos fazerem parte do local de ligação são exibidos numa tabela. Para cada resíduo é exibido o seu nº e o código de aminoácido é exibido (ex:Arg159). As outras colunas exibem o número de ligandos que estão em contato ou próximos do resíduo tal como descrito em baixo:

Contacto(s)- O nº de ligandos que estão dentro da distância de separação de 0.8 Angstroms aos aminoácidos. Admite-se que os ligandos que estão dentro da distância de separação de 0.8 Å em relação a um resíduo da proteína de interesse, estabelecem contacto/interação com este. (incluindo o seu raio (radii) Van der Waals). E.g. Residuo 48 contacta 9 ligandos

Distância média- A distância média de separação entre o resíduo e todos os ligandos que se encontram dentro de 0.8 Å em relação a esse resíduo. Só são considerados/sobrepostos os ligandos que se encontram dentro da distância máxima de 0.8 Å em relação ao resíduo. 0 Å (i.e. os ligandos tocam diretamente no resíduo)

Tabelas de Ligandos

A tabela de ligandos indica os ligandos que estão presentes no ‘cluster’ de ligandos que está a ser utilizado na previsão do local de ligação. O nº de cada tipo de ligando assim como o código PDB das estruturas de proteínas das quais originaram são também exibidas.

Tabela 3- Informação referente ao Cluster 1.

| Local de Ligação Previsto | | | | |
|---------------------------|---|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| Cluster | Resíduo | Aminoácido | Contacto(s) | Distância média (Angstroms) |
| 1 | 21 | Arg | 5 | 0.00 |
| | 26 | Arg | 4 | 0.21 |
| | 52 | Lys | 7 | 0.00 |
| | 114 | Lys | 6 | 0.50 |
| | 116 | Arg | 4 | 0.19 |
| | Ligandos presentes no Sítio de Ligação Previsto | | | |
| | Ligando | Nº de Ligandos | Estruturas de origem (PDB) | |
| | N-acetilglucosamina | 5 | 1lrh_C,2ete_B,1lr5_C | |
| | β -manose | 2 | 1lrh_C,1lr5_C | |
| | α -manose | 6 | 1lrh_C,1lr5_C | |

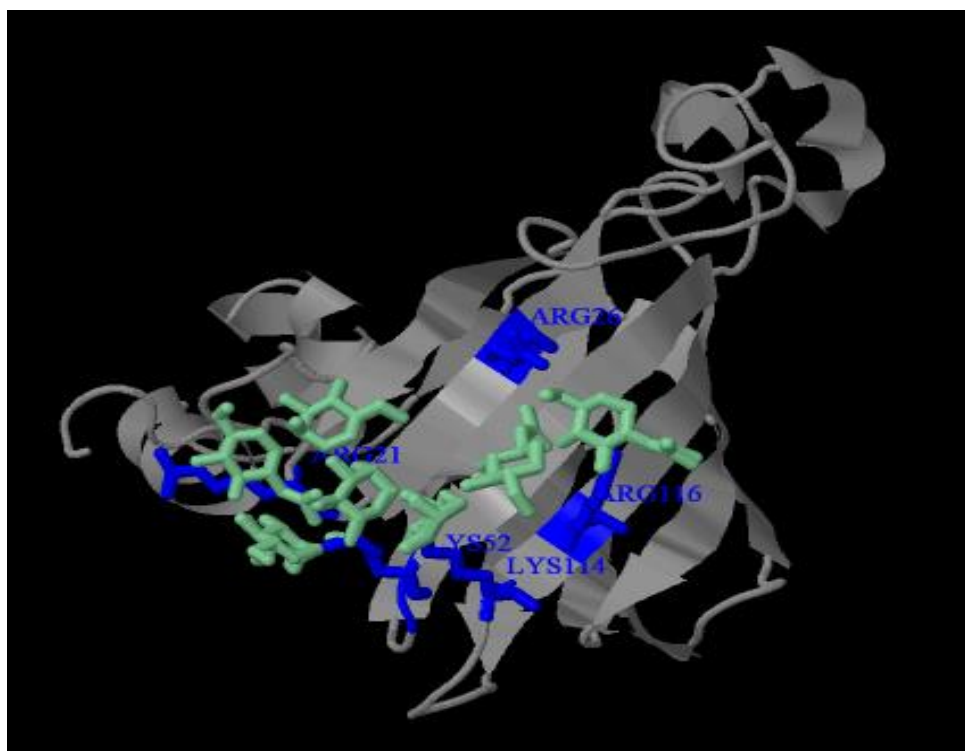


Figura 19- Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 1). O local de ligação previsto está representado a azul e os aminoácidos que o constituem estão representados a azul em formato ‘wireframe’. Os ligandos manose, β - manose e *N*-acetilglucosamina que fazem parte do ‘Cluster’ 1 estão representados a verde em formato ‘wireframe’.

Tabela 4- Informação referente ao Cluster 2.

| Local de Ligação Previsto | | | | |
|---------------------------|---|----------------|-------------|----------------------------|
| Cluster | Resíduo | Aminoácido | Contacto(s) | Distância média |
| 2 | 142 | Gln | 1 | 0.70 |
| | Ligandos presentes no Sítio de Ligação Previsto | | | |
| | Ligando | Nº de Ligandos | | Estruturas de origem (PDB) |
| | Magnésio (Mg) | 2 | | 1l3j_A,1j58_A |

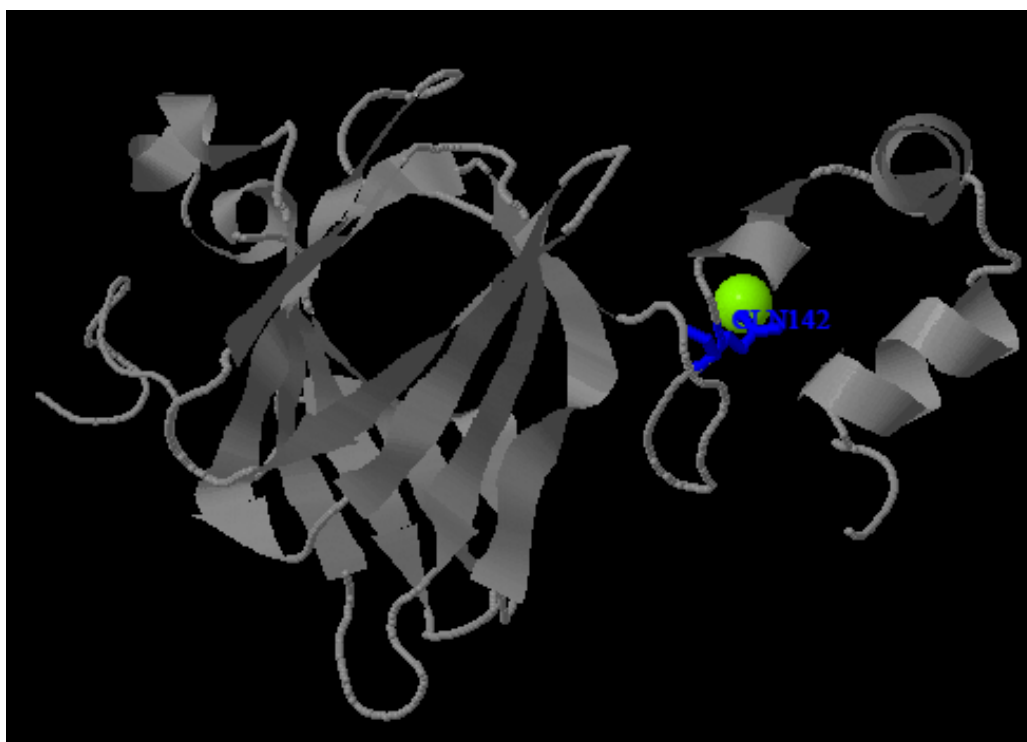


Figura 20- Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 2). O local de ligação previsto está representado a azul e o aminoácido que o constitui está representado a azul em formato ‘wireframe’. O íon ligando magnésio que faz parte do ‘Cluster’ 2 está representado a verde em formato ‘spacefill’.

Tabela 5- Informação referente ao Cluster 3.

| Local de Ligação Previsto | | | | |
|---------------------------|---|------------|----------------|----------------------------|
| Cluster | Resíduo | Aminoácido | Contacto(s) | Distância média |
| 3 | 88 | Tyr | 1 | 0.00 |
| | Ligandos presentes no Sítio de Ligação Previsto | | | |
| | Ligando | | Nº de Ligandos | Estruturas de origem (PDB) |
| | Cálcio (Ca) | | 1 | 3fz3_C |

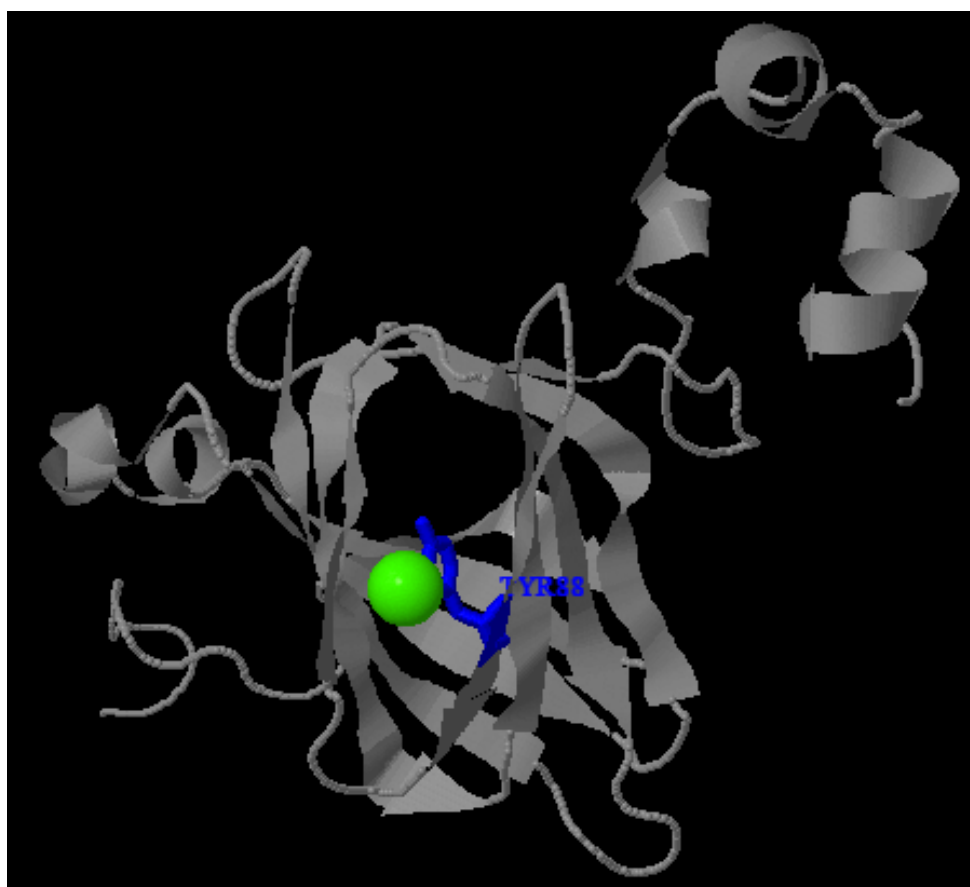


Figura 21- Visualização em ‘Jmol applet’ no 3DligandSite exibindo a estrutura tridimensional do polipéptido Blad com o local de ligação previsto (Cluster 3). O local de ligação previsto está representado a azul e o aminoácido que o constitui está representado a azul em formato ‘wireframe’. O íon ligando cálcio que faz parte do ‘Cluster’ 3 está representado a verde em formato ‘spacefill’.

Através da previsão dos locais de ligação na estrutura tridimensional prevista do polipéptido Blad, verifica-se que o ‘cluster’ 1 (Figura 19) é constituído pelos aminoácidos lisina e arginina que interagem com os açúcares α -manose, β -manose e *N*-acetilglucosamina (ligandos). Este é o ‘cluster’ principal por ter maior nº de ligandos, definindo portanto o local de ligação principal previsto para o polipéptido Blad, reforçando a hipótese de o polipéptido Blad possuir atividade de lectina.

O polipéptido Blad liga-se a uma variedade de glicoproteínas, assumindo-se que esta ligação/interação é do tipo lectina. Uma das glicoproteínas à qual o polipéptido Blad se liga é a peroxidase de rábano [10]. A glicana maioritária da peroxidase de rábano é (Xyl)Man₃(Fuc)GlcNAc₂ com a estrutura: α -Man-(1 \rightarrow 6)[α -Man-(1 \rightarrow 3)][β -Xyl-(1 \rightarrow 2)]- β -Man-(1 \rightarrow 4)- β -GlcNAc-(1 \rightarrow 4)[α -Fuc-(1 \rightarrow 3)]-GlcNAc. Esta glicana constitui 75% a 80% do total de glicanas da peroxidase de rábano e pertence à família de glicanas (Xyl)_xMan_m(Fuc)_fGlcNAc₂ ($m = 2, 4, 5, 6; f = 0$ or $1; x = 0$ ou 1), sendo que a maioria das restantes glicanas da peroxidase de rábano pertence a esta mesma família. Menos de 5% das glicanas da peroxidase de rábano pertencem à família de glicanas Man_mGlcNAc₂ ($m = 4$ a 7) [166]. As glicanas da peroxidase de rábano possuem no seu terminal não-redutor manose, e visto que os ligandos no local de ligação previsto principal (Fig. 19) do polipéptido Blad incluem a α -manose e a β -manose, e assumindo também que a maioria das lectinas interage especificamente com o terminal não-redutor de glicanas de glicoproteínas [14], permite inferir que o polipéptido Blad possui elevada probabilidade de interagir com glicanas em que o seu terminal não-redutor seja constituído por α -manose e/ou β -manose.

O magnésio e o cálcio são ligandos que fazem parte de outros dois locais de ligação previstos do polipéptido Blad (Figura 20 e Figura 21, respetivamente). A proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad auto-agrega-se na presença de Mg²⁺ e Ca²⁺ [13], pondo-se a hipótese de o polipéptido Blad participar, através do local de ligação previsto para o magnésio e/ou através do local de ligação previsto para o cálcio, no processo de auto-agregação da proteína de 210 kDa que é dependente de Mg²⁺ e Ca²⁺.

III.11.3. Ferramenta bioinformática STRING

Foram introduzidos na ferramenta bioinformática STRING os números de acesso Uniprot de toda a lista (120 hits) de proteínas estruturalmente homólogas ao polipéptido Blad fornecidas pelo Phyre, assim como os números de acesso Uniprot dos primeiros 150 ‘hits’ (proteínas) de PSI-Blast (homologia de sequência de aminoácidos) realizado à sequência do polipéptido Blad. É de notar que o polipéptido Blad não está presente na base de dados da STRING, assim como várias proteínas com homologia de sequência de aminoácidos (PSI-Blast) e com homologia estrutural (Phyre) ao polipéptido Blad.

O objetivo desta pesquisa foi tentar encontrar, com a ferramenta bioinformática STRING, interações/associações proteína-proteína entre o polipéptido Blad, ou as proteínas que lhe são homólogas em sequência ou estrutura, e proteínas de *Candida albicans*.

Na STRING foi dada especial atenção à opção de visualização de ação (‘action view’) dos resultados de associação/interação gerados, sendo que este tipo de visualização fornece informações entre associações/interações de proteína-proteína, tais como: ativação, inibição, ligação (o mais importante no contexto deste estudo), fenótipo, catálise, mecanismo pós-tradução, reação e expressão. Neste contexto não foi encontrada nenhuma associação/interação proteína-proteína, que fosse relevante ao objetivo desta pesquisa, entre as proteínas homólogas ao polipéptido Blad, em sequência ou em estrutura, e proteínas de *C. albicans*.

III.11.4. Ferramenta bioinformática ClusPro

De modo a estudar as possíveis interações entre o polipéptido Blad e as proteínas associadas à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação a este, que foram identificadas neste trabalho, recorreu-se à previsão de ancoragem/‘docking’ de proteínas utilizando o ‘software’ ClusPro 2.0

Escolheu-se o melhor modelo de ‘docking’, tanto entre a proteína enolase 1 e o polipéptido Blad (Figura 22) como entre a proteína subunidade beta da ATP sintetase e o polipéptido Blad (Figura 23), tendo sido nos dois casos o que obteve o maior tamanho de

agrupamento de todos os modelos presentes no conjunto de resultados de ancoragem (Balanced) fornecidos pelo 'software' ClusPro 2.0.

Estes dois modelos de 'docking' escolhidos para representação neste trabalho obtiveram o melhor 'score' ClusPro do centro do agrupamento e o melhor (mais baixo) 'score' ClusPro presente no agrupamento, de todos os modelos de 'docking' (cada um com um respetivo tamanho de agrupamento) presentes no conjunto de resultados de ancoragem (Balanced).

A proteína enolase 1 foi identificada neste trabalho como sendo uma proteína associada à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad. A Figura 22 representa um possível modelo de 'docking' entre a proteína enolase 1 de *C. albicans* (representada a cinzento), e o polipéptido Blad de *L. albus* (representado a azul). Este modelo de 'docking' aparenta possuir um grau de confiança razoável, mesmo atendendo ao facto das estruturas da proteína enolase 1 de *C. albicans* e do polipéptido Blad ainda não terem sido determinadas experimentalmente, tendo no entanto sido previstas pela ferramenta bioinformática Phyre com uma elevada confiança na modelação da estrutura destas duas proteínas (99% e 100% dos resíduos modelados com >90% de precisão, respetivamente). No seu conjunto estes resultados talvez permitam sugerir um bom grau de confiança em relação a este possível modelo de 'docking', reforçando assim a possibilidade do polipéptido Blad se ligar/interagir/ancorar com a proteína enolase 1 de *C. albicans*, que se encontra associada à sua membrana plasmática/parede celular, podendo deste modo inibir/inativar esta proteína que poderá levar a consequências nocivas para as células de *C. albicans*.

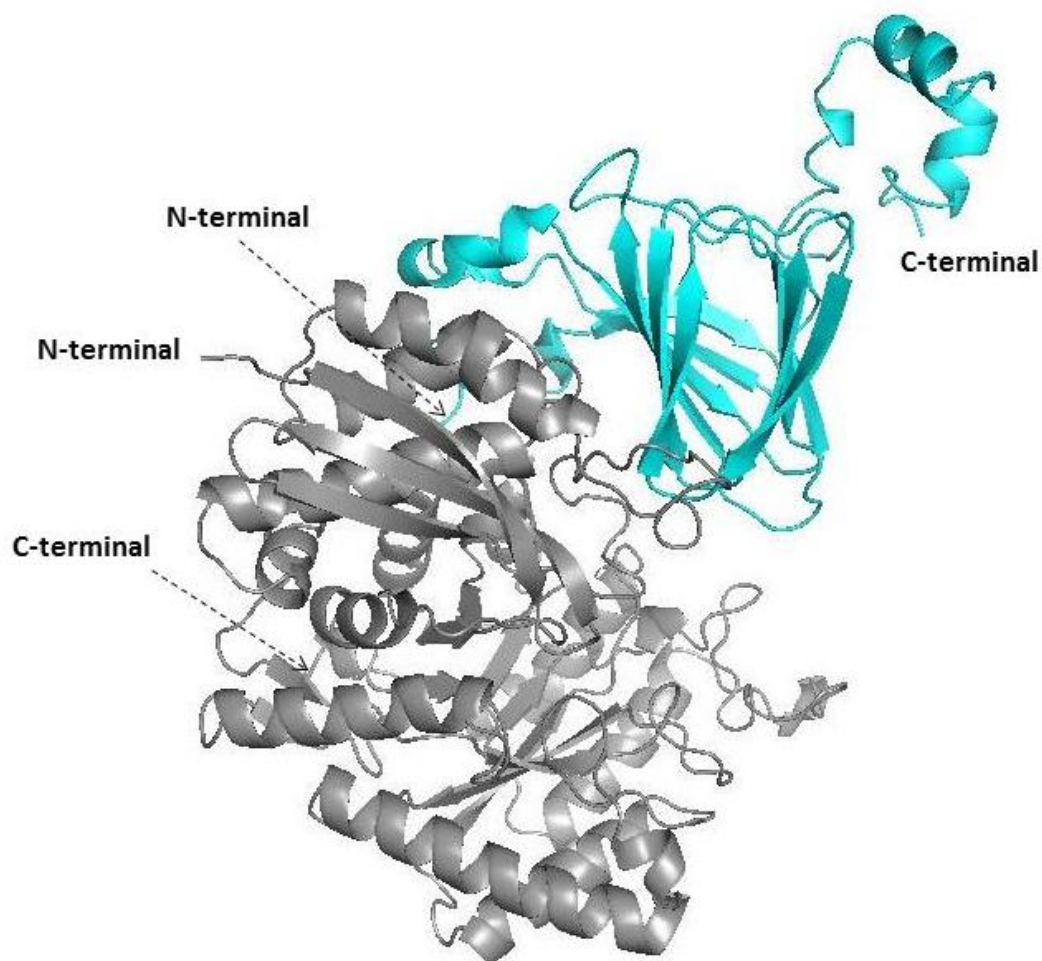


Figura 22- Visualização em ‘Pymol’ da ancoragem/’docking’ efetuada no ‘software’ ClusPro2, entre a proteína enolase 1 de *C. albicans*, representada a cinzento, e o polipéptido Blad de *L. albus*, representado a azul. Indicam-se também na figura os terminais N- e C- da proteína e do polipéptido.

A proteína subunidade beta da ATP sintetase foi identificada neste trabalho como sendo uma proteína associada à membrana plasmática/parede celular de *C. albicans* com possível afinidade de ligação ao polipéptido Blad. A Figura 23 representa um possível modelo de docking entre a proteína subunidade beta da ATP sintetase de *C. albicans* (representada a cinzento), e o polipéptido Blad de *L. albus* (representado a azul). Este modelo de docking aparenta possuir um grau de confiança razoável, mesmo atendendo ao facto das estruturas da proteína subunidade beta da ATP sintetase de *C. albicans* e do polipéptido Blad ainda não terem sido determinadas experimentalmente, tendo no entanto sido previstas pela ferramenta bioinformática Phyre, com uma baixa e elevada confiança na modelação da estrutura destas duas proteínas, respetivamente (23% e 100% dos

resíduos modelados com >90% de precisão, respetivamente). No seu conjunto estes resultados talvez permitam sugerir um razoável grau de confiança em relação a este possível modelo de 'docking', reforçando assim a possibilidade de o polipéptido Blad se ligar/interagir/ancorar com a proteína subunidade beta da ATP sintetase de *C. albicans*, que se encontra associada à sua membrana plasmática/parede celular, podendo deste modo inibir/inativar esta proteína que poderá levar a consequências nocivas para as células de *C. albicans*.

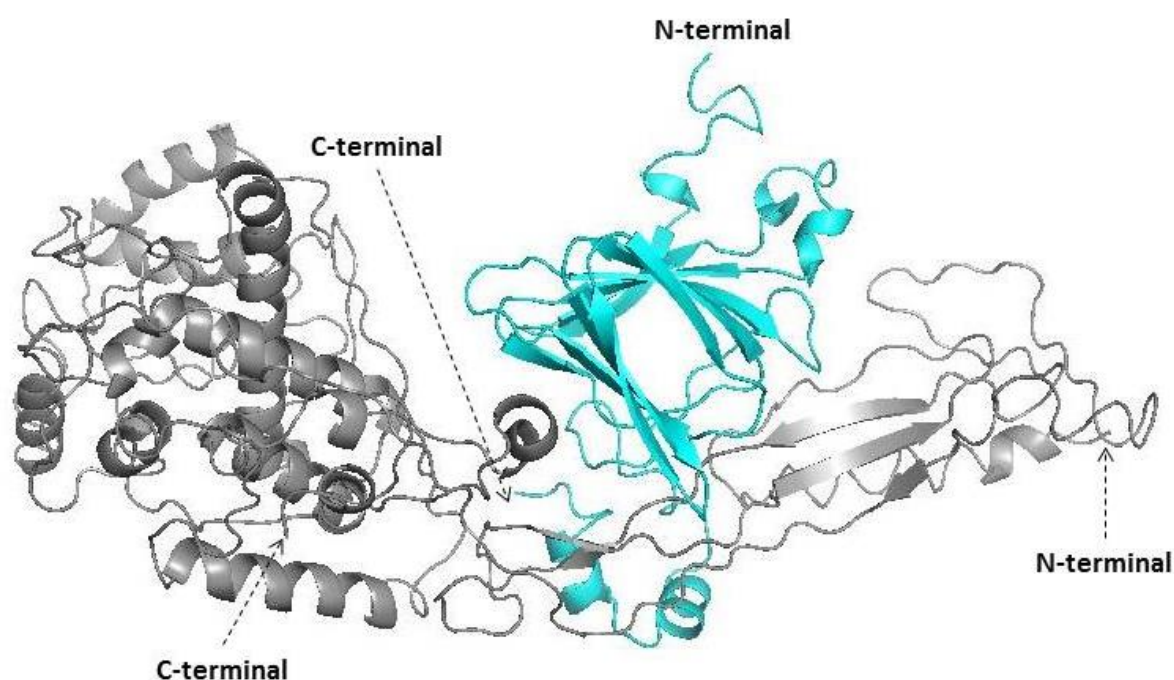


Figura 23- Visualização em 'Pymol' da ancoragem/'docking' efetuada no 'software' ClusPro2, entre a proteína subunidade beta da ATP sintetase de *C. albicans*, representada a cinzento, e o polipéptido Blad de *L. albus*, representado a azul. Indicam-se também na figura os terminais N- e C- da proteína e do polipéptido.

IV - CONCLUSÕES

Na totalidade dos ensaios de imunodeteção do polipéptido Blad na sua ligação às proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, verificou-se que este se liga a: uma proteína de massa molecular aproximada de 75 kDa, uma proteína de massa molecular aproximada de 50 kDa, duas proteínas de massa molecular aproximada de 37 kDa, duas proteínas de massa molecular aproximada de 25 kDa, uma proteína de massa molecular aproximada de 20 kDa, uma proteína de massa molecular aproximada de 15 kDa, uma proteína de massa molecular aproximada de 10 kDa.

No ensaio de imunodeteção do polipéptido Blad na fração total das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* desglicosiladas parcialmente e totalmente com ácido periódico, verificou-se que mesmo após estes tratamentos o polipéptido Blad se continuou a ligar à(s) proteína(s) na banda de massa molecular aproximada de 25 kDa, pelo que existe a possibilidade de que a interação do polipéptido Blad com esta proteína não seja uma interação do tipo lectina, mas sim uma interação proteína-proteína. No caso da banda de massa molecular aproximada de 10 kDa, esta só foi visível no ensaio de imunodeteção sem desglicosilação das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, não sendo visível nos ensaios de imunodeteção com desglicosilação (com ácido periódico) parcial e total, o que permite inferir que as glicanas desta glicoproteína de 10 kDa são responsáveis pela ligação do polipéptido Blad a esta, ou seja o polipéptido Blad liga a esta proteína através de uma interação do tipo lectina.

Os resultados bioinformáticos em relação à previsão de possíveis locais de ligação a ligandos, do polipéptido Blad, reforçaram a assunção de que este possui atividade de lectina, pois os monossacarídeos manose e *N*-acetilglucosamina foram previstos ligarem-se no mesmo local de ligação previsto (principal).

O procedimento de co-imunoprecipitação do polipéptido Blad com as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade a este não obteve sucesso, pois não se conseguiu isolar nenhuma proteína. No entanto tentou-se um procedimento alternativo com o objetivo de identificar as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade ao polipéptido Blad, embora este procedimento possua elevada probabilidade de originar falsos positivos. Foram isoladas quatro proteínas com possível afinidade ao polipéptido Blad através de correspondência entre as bandas nas quais o polipéptido Blad foi imunodetado e as bandas de idêntica massa molecular presentes no perfil eletroforético das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans*, no gel de poliácridamida. Estas quatro proteínas, a enolase 1, a álcool desidrogenase 1, a subunidade beta da ATP sintetase

e a sulfonato dioxigenase dependente de alfa-cetoglutarato, foram identificadas por espectrometria de massa. Apesar da função da enolase 1, da álcool desidrogenase 1 da subunidade beta da ATP sintetase ser pouco clara quando presentes na parede celular ou quando presentes na superfície da célula associadas à membrana plasmática, a sua função nestas duas localizações extracelulares deverá ser importante para o normal funcionamento das células de *C. albicans*. Visto que o polipéptido Blad se liga a estas proteínas (inferido pelo ensaio de imunodeteção no capítulo III.9), põe-se a possibilidade de as inativar/inibir de algum modo, o que muito provavelmente provoca alterações no normal funcionamento das células de *C. albicans*, podendo deste modo levar à sua morte.

Não foi possível realizar a análise das glicanas das proteínas associadas à membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade ao polipéptido Blad, que foram identificadas neste trabalho, devido a limitações experimentais.

Visto que o procedimento de co-imunoprecipitação do polipéptido Blad com as proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade a este não obteve sucesso, deveria tentar-se imobilização covalente da proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad de 20 kDa em ‘beads’ magnéticas, de forma a que o polipéptido Blad mantivesse a sua atividade de lectina. É razoável admitir que este procedimento de isolamento das proteínas da membrana plasmática de *C. albicans* com afinidade ao polipéptido Blad poderá ter mais probabilidade de sucesso que o procedimento de imunoprecipitação utilizado. Este método permitiria eliminar os problemas associados ao procedimento da co-imunoprecipitação do polipéptido Blad com as proteínas de *C. albicans* que possuem afinidade de ligação a este. De referir que no procedimento de co-imunoprecipitação realizado neste trabalho, o objetivo seria formar o seguinte complexo multimolecular: ‘beads’ magnéticas--proteína recombinante A/G—anticorpo anti-Blad—polipéptido Blad—proteína de *C. albicans*. Com o procedimento de imobilização em ‘beads’ magnéticas da proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad de 20 kDa formar-se-ia o seguinte complexo multimolecular mais simples: ‘beads magnéticas’—Blad (ligada covalentemente às ‘beads’)—proteínas de *C. albicans*.

Outra alternativa para o isolamento das proteínas de *C. albicans* com afinidade de ligação ao polipéptido Blad seria a imobilização em ‘beads’ magnéticas da proteína de 210 kDa que incorpora o polipéptido Blad, através da ligação da proteína de 210 kDa biotinilada com a streptavidina que se encontra ligada covalentemente a ‘beads’ magnéticas. A biotina possui elevada afinidade de ligação à streptavidina.

Outra possibilidade que não deve ser posta de parte é a do polipéptido Blad se ligar/interagir com os fosfolípidos da membrana plasmática de *C. albicans*, e de algum modo provocar destabilização na membrana, o que poderá levar a várias possíveis consequências nocivas para a célula. Devido ao polipéptido Blad possuir carga líquida positiva em condições fisiológicas (pH 7), pois apresenta um ponto isoelétrico (PI) de 9,6, poderá ligar/interagir eletrostaticamente com os grupos fosfato de carga negativa dos fosfolípidos da membrana plasmática, através dos aminoácidos lisina e arginina que possuem cadeias laterais carregadas positivamente. De referir que o polipéptido Blad apresenta uma proporção relativamente elevada destes aminoácidos, arginina (18 resíduos em 173) e lisina (7 resíduos). Considerando esta possibilidade de ligação/interação eletroestática entre o polipéptido Blad e os fosfolípidos da membrana plasmática de *C. albicans* que poderá causar efeitos nocivos para as células, estudos no sentido de averiguar sobre esta possibilidade são necessários.

V - BIBLIOGRAFIA

- [1] Monteiro S, Freitas R, Rajasekhar BT, Teixeira AR, Ferreira RB (2010) The unique biosynthetic route from *Lupinus* beta-conglutinin gene to Blad. PLoS ONE 5: 1-11
- [2] Shutov AD, Baumlein H, Blattner FR, Muntz K (2003) Storage and mobilization as antagonistic functional constraints on seed storage globulin evolution. Journal of Experimental Botany 54: 1645–1654.
- [3] Duranti M, Guerrieri N, Cerletti P, Vecchio G (1992) The legumin precursor from white lupin seed. Identity of the subunits, assembly and proteolysis. European Journal of Biochemistry 206: 941–947.
- [4] Lilley GG (1999) In: Seed Proteins Shewry PR, Casey R, eds. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 315–354.
- [5] Mossé J, Pernollet JC (1983) Storage proteins of legume seeds. In: Chemistry and Biochemistry of Legumes, Ed. Arora, London, Edward Arnold. pp 111–193.
- [6] Melo TS, Ferreira RB, Teixeira AN (1994) The seed storage proteins from *Lupinus albus*. Phytochemistry 37: 641–648.
- [7] Ferreira RB, Melo TS, Teixeira AN (1995) Catabolism of the seed storage proteins from *Lupinus albus*: Fate of globulins during germination and seedling growth. Australian Journal of Plant Physiology 22: 373–381.
- [8] Franco E, Ferreira RB, Teixeira AR (1997) Utilization of an improved methodology to isolate *Lupinus albus* conglutinins in the study of their sedimentation coefficients. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3908–3913.
- [9] Ferreira RB, Ramos PR, Franco E, Ricardo CP, Teixeira AN (1995) Changes in ubiquitin and ubiquitin-protein conjugates during seed formation and germination. Journal of Experimental Botany 46: 211–219.
- [10] Ramos PR, Ferreira RB, Franco E, Teixeira AN (1997) Accumulation of a lectin-like breakdown product of beta-conglutinin catabolism in cotyledons of germinating *Lupinus albus* L seeds. Planta 203: 26–34.
- [11] Blagrove R, Gillespie JM (1975) Isolation, purification and characterisation of the seeds globulins of *Lupinus angustifolius*. Australian Journal of Plant Physiology 2: 13–27.
- [12] Cerletti P, Duranti M, Restani P (1983) Properties of lupine proteins relevant to their nutritional performance. Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition 32: 145–154.

- [13]- Ferreira RB, Freitas RL, Teixeira AR (2003) Self-aggregation of legume seed storage proteins inside the protein storage vacuoles is electrostatic in nature, rather than lectin-mediated. *FEBS Letters* 534: 106-110.
- [14] Ferreira RB, Freitas RF, Monteiro S (2012) Targeting carbohydrates: a novel paradigm for fungal control. *European Journal of Plant Pathology* 133: 117–140.
- [15] Miceli MH, Díaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infectious Diseases* 11: 142-151.
- [16] Person AK, Kontoyiannis DP, Alexander BD (2010) Fungal infections in transplant and oncology patients. *Infectious Disease Clinics of North America* 24: 439-459.
- [17] Abadio AR, Kioshima ES, Teixeira MM, Martins NF, Maigret B, Felipe MS (2011) Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics* 12: 75
- [18] Kotlerbr J, Price HD, Medoff G, Schlessi D, Kobayash GC (1974) The molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal oils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 5: 377–382.
- [19] Odds FC, Brown AP, Gow NR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11: 272-279.
- [20] Vandenbossche H, Koymans L, Moereels H (1995) P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacology & Therapeutics* 67: 79–100.
- [21] Kelly SL, Lamb DC, Baldwin BC, Corran AJ, Kelly DE (1997) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* cyp61, sterol D22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *Journal of Biological Chemistry* 272: 9986–9988.
- [22] Marichal P, Gorrens J, Vandenbossche H (1985) The action of itraconazole and ketoconazole on growth and sterol synthesis in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* 22: 13–21.
- [23] Johnson MD, Perfect JR (2010) Use of Antifungal Combination Therapy: Agents, Order, and Timing. *Current Fungal Infection Reports* 4: 87-95.
- [24] Odds FC (2003) Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. *Mycologist* 17: 51-55.
- [25] Delom F, Szponarski W, Sommerer N, Boyer JC, Bruneau JM, Rossignol M, Gibrat R (2006) The plasma membrane proteome of *Saccharomyces cerevisiae* and its response to the antifungal calcofluor. *Proteomics* 6: 3029–3039.

- [26] Tan S, Tan HT, Chung MC, Maxey CM (2008) Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics* 8: 3924–3932.
- [27] Bruneau JM, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C, Latge JP (2001) Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 22: 2812–2823.
- [28] Theis T, Stahl U (2004). Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 437–455.
- [29] Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55: 4– 30.
- [30] Brennan PJ, Griffin PF, Losel DM, Tyrrell D (1974) The lipids of fungi. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 14: 49–89.
- [31] Rattray JB, Schibeci A, Kidby DK (1975) Lipids of yeasts. *Bacteriological Reviews* 39: 197–231.
- [32] Morschhauser J (2002) The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis Disease* 1587: 240–248.
- [33] Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annual Review of Microbiology* 49: 95–116.
- [34] Lupetti A, Danesi R, Campa M, Del Tacca M, Kelly S (2002) Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 8: 76–81.
- [35] Jensen-Pergakes KL, Kennedy MA, Lees ND, Barbuch R, Koegel C, Bard M (1998) Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (*ERG6*) gene: drug susceptibility studies in *erg6* mutants. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 42: 1160–1167.
- [36] Jia N, Arthington-Skaggs B, Lee W, Pierson CA, Lees ND, Eckstein J, Barbuch R, Bard M (2002) *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the *ERG24* gene, as a potential antifungal target site. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46: 947–957.
- [37] Sanglard D, Ischer F, Parkinson T, Falconer D, Bille J (2003) *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47: 2404–2412.

- [38] Young LY, Hull CM, Heitman J (2003) Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 47: 2717–2724.
- [39] Meroni V, Zerrilli E, Genco F, Nocita B, Poletti F, et al. (2006) Infection in the immunocompromised host (except HIV). *Clinical Microbiology Infections* 12: 679–940.
- [40] Garber G (2001) An overview of fungal infections. *Drugs* 61: 1–12.
- [41] Richardson MD (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 5–11.
- [42] Ruhnke M (2006) Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. *Current Drug Targets* 7: 495–504.
- [43] Gozalbo D, Roig P, Villamon E, Gil ML (2004) *Candida* and Candidiasis: The cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Current Drug Targets Infectious Disorders* 4: 117–135.
- [44] Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R (2007) Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species, a review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 54: 201–235.
- Candida-albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7: 495–504.
- [45] Brown E, Wright G (2005) New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chemical Reviews* 105: 759–774.
- [46] Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 112–124.
- [47] Insenser M, Nombela C, Molero G, Gil C (2006) Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*. *Proteomics* 6: 74–81.
- [48] Futerman AH, Riezman H (2005) The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends in Cell Biology* 15: 312–318.
- [49] Wachtler V, Balasubramanian MK (2006) Yeast lipid rafts? An emerging view. *Trends in Cell Biology* 16: 1–4.
- [50] Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of Lipid Research* 44: 655–667.
- [51] Martin SW, Konopka JB (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell* 3: 675–684.
- [52] Bagnat M, Simons K (2002) Lipid rafts in protein sorting and cell polarity in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Chemistry* 383: 1475–1480.

- [53] Grossmann G, Opekarova M, Novakova L, Stolz J, Tanner W (2006) Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 5: 945–953.
- [54] Malinska K, Malinsky J, Opekarova M, Tanner W (2003) Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4427–4436.
- [55] Wachtler V, Rajagopalan S, Balasubramanian MK (2003) Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science* 116: 867–874.
- [56] Bagnat M, Simons K (2002) Cell surface polarization during yeast mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 14183–14188.
- [57] Insenser M, Nombela C, Molero G, Gil C (2006) Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*. *Proteomics* 6: 74–81.
- [58] Alvarez F J, Konopka JB (2007) Identification of an *N*-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*. *Molecular Biology of Cell* 18: 965–975.
- [59] Cabezon V, Llama-Palacios A, Nombela C, Monteoliva L, Gil C (2009) Analysis of *Candida albicans* plasma membrane proteome. *Proteomics* 9: 4770–4786.
- [60] Gornik O, Dumi J, Flogel M, Lauc G (2006) Glycoscience – a new frontier in rational drug design. *Acta Pharmaceutica*, 56: 19–30.
- [61] Deshpande N, Wilkins MR, Packer N, Nevalainen H (2008) Protein glycosylation pathways in filamentous fungi. *Glycobiology* 18: 626–637.
- [62] Zaia J (2008) Mass spectrometry and the emerging field of glycomics. *Chemistry & Biology* 15: 881–892.
- [63] Zaia J (2010) Mass spectrometry and glycomics. *OMICS-A Journal of Integrative Biology* 14: 401–418.
- [64] Hohl TM, Feldmesser M (2007) *Aspergillus fumigatus*: Principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryotic Cell* 6: 1953–1963.
- [65] Pilobello KT, Mahal LK (2007) Deciphering the glycode: The complexity and analytical challenge of glycomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 11: 300–305.
- [66] An HJ, Lebrilla CB (2010) Structure elucidation of native *N*- and *O*-linked glycans by tandem mass spectrometry (tutorial). *Mass Spectrometry Reviews* 30: 560–578.

- [67] Rudiger H, Gabius HJ (2001) Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal* 18: 589–613.
- [68] Lis H, Sharon N (1998) Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews* 98: 637–674.
- [69] Rudiger H, Gabius HJ (2009) Plant lectins. In H. J. Gabius (Ed.), *The sugar code. Fundamentals of Glycosciences*, 9: 301–315.
- [70] Peumans WJ, Van Damme EM (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109: 347–352.
- [71] Varki, A (2009) *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 1.
- [72] Peter-Katalinic J (2005) Methods in enzymology: *O*-glycosylation of proteins. *Methods in Enzymology* 405: 139–171.
- [73] North SJ, Hitchen PG, Haslam SM, Dell A (2009) Mass spectrometry in the analysis of *N*-linked and *O*-linked glycans. *Current Opinion in Structural Biology* 19: 498–506.
- [74] Ruhaak LR, Zauner G, Huhn C, Bruggink C, Deelder AM, Wuhler M (2010) Glycan labeling strategies and their use in identification and quantification. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 397: 3457–3481.
- [75] Geyer H, Geyer R (2006) Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1764: 1853–1869.
- [76] Dwek RA, Edge CJ, Harvey, DJ, Wormald MR, Parekh RB (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 62: 65–100.
- [77] Zauner G, Kozak RP, Gardner RA, Fernandes DL, Deelder AM, Wuhler M (2012) Protein *O*-glycosylation analysis. *Biological Chemistry* 393: 687–708.
- [78] Harvey DJ (2005) Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of *N*- and *O*-linked glycans by mass spectrometry. *Expert Review of Proteomics* 2: 87–101.
- [79] Morelle W, Michalski JC (2005) The mass spectrometric analysis of glycoproteins and their glycan structures. *Current Analytical Chemistry* 1: 29–57.
- [80] Pabst M, Altmann F (2011) Glycan analysis by modern instrumental methods. *Proteomics* 11: 631–643.
- [81] Alley WR, Mann BF, Novotny MV (2013) High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins. *Chemical Reviews* 113: 2668–2732.

- [82] Harvey DJ (2005) Structural determination of *N*-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics* 5: 1774–1786.
- [83] Morelle W, Michalski JC (2007) Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols* 2: 1585–1602.
- [84] Sagil D, Kienz P, Denecke J, Marquardt T, Peter-Katalinic J (2005) Glycoproteomics of *N*-glycosylation by in-gel deglycosylation and matrix-assisted laser desorption/ionisation- time of flight mass spectrometry mapping: application to congenital disorders of glycosylation. *Proteomics* 5: 2689–2701.
- [85] Papac DI, Wong A, Jones AJS (1996) Analysis of acidic oligosaccharides and glycopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 68: 3215–3223.
- [86] Ruhaak LR, Huhn C, Waterreus WJ, de Boer AR, Neususs C, Hokke CH, Deelder AM, Wuhrer M (2008) Hydrophilic interaction chromatography-based highthroughput sample preparation method for *N*-glycan, analysis from total human plasma glycoproteins. *Analytical Chemistry* 80: 6119–6126.
- [87] Harvey DJ (2005) Structural determination of *N*-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics* 5: 1774–1786.
- [88] Gil GC, Iliff B, Cerny R, Velandar WH, Van Cott KE (2010) High throughput quantification of *N*-glycans using one-pot sialic acid modification and matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 82: 6613–6620.
- [89] Kuster B, Hunter AP, Wheeler SF, Dwek RA, Harvey DJ (1998) Structural determination of *N*-linked carbohydrates by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry following enzymatic release within sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide electrophoresis gels: application to species-specific glycosylation of alpha(1)-acid glycoprotein. *Electrophoresis* 19: 1950–1959.
- [90] Toyoda M, Ito H, Matsuno YK, Narimatsu H, Kameyama A (2008) Quantitative derivatization of sialic acids for the detection of sialoglycans by MALDI MS. *Analytical Chemistry* 80: 5211–5218.

- [91] Alley WR, Madera M, Mechref Y, Novotny MV (2010) Chip-based reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry of permethylated *N*-linked glycans: a potential methodology for cancer-biomarker discovery. *Analytical Chemistry* 82: 5095–5106.
- [92] Costello CE, Contado-Miller JM, Cipollo JF (2007) A glycomics platform for the analysis of permethylated oligosaccharide alditols. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18: 1799–1812.
- [93] Reinhold VN, Sheeley DM (1998) Detailed characterization of carbohydrate linkage and sequence in an ion trap mass spectrometer: glycosphingolipids. *Analytical Biochemistry* 259: 28–33.
- [94] Wada Y, Dell A, Haslam SM, Tissot B, Canis K, Azadi P, Backstrom M, Costello CE, Hansson GC, Hiki, Y., et al. (2010). Comparison of methods for profiling *O*-glycosylation: Human Proteome Organisation Human Disease Glycomics/ Proteome Initiative multi-institutional study of IgA1. *Molecular & Cellular Proteomics* 9: 719 – 727.
- [95] Pinheiro AS. (2012). Master Thesis: A differential polypeptide approach to fight human fungal pathogens. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal.
- [96] Borch J, Roepstorff P, Møller-Jensen J (2011) Nanodisc-based Co-immunoprecipitation for Mass Spectrometric Identification of Membrane-interacting Proteins. *Molecular and Cellular Proteomics* 10: O110.006775
- [97] Gohon Y, Popot JL (2003) Membrane protein-surfactant complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. 8: 15–22.
- [98] Hunte C, von Jagow G, Schagger H (2003) *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*. Oxford, UK: Academic Press.
- [99] Thermo Scientific - Pierce Protein Biology Products - Co-immunoprecipitation (Co-IP) [Internet] Disponível em: <http://www.piercenet.com/method/co-immunoprecipitation-co-ip>
- [100]-Phizicky E. M. and Fields S. (1995) Protein-protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev*. 59, 94-123.
- [101]-Golemis E. (2002) *Protein-protein interactions: A molecular cloning manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ix, 682.
- [102] GE Healthcare Life Sciences. (2007). PD-10 Desalting Columns.

- [103] Bradford MM (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- [104]- Baker D, Sali A (2001) Protein structure prediction and structural genomics. *Science* 294: 93–96.
- [105]- Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363-371.
- [106]- Watson JD, Laskowski RA, Thornton JM (2005) Predicting protein function from sequence and structural data. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 275–284.
- [107]- Qian B et al. (2007) High-resolution structure prediction and the crystallographic phase problem. *Nature* 450: 259–264.
- [108]- Rava P, Hussain MM (2007) Acquisition of triacylglycerol transfer activity by microsomal triglyceride transfer protein during evolution. *Biochemistry* 46: 12263–12274.
- [109]- Park H et al. (2008) Discovery of novel alpha-glucosidase inhibitors based on the virtual screening with the homology-modeled protein structure. *Bioorganic Medicine Chemistry* 16: 284–292.
- [110]- Murzin AG, Brenner SE, Hubbard T, Chothia C (1995) SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology* 247: 536–540.
- [111]- Berman HM et al. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235–242.
- [112]- McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404–405.
- [113]- Pollastri G, Przybylski D, Rost B, Baldi P (2002) Improving the prediction of protein secondary structure in three and eight classes using recurrent neural networks and profiles. *Proteins* 47: 228–235.
- [114]- Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research* 36: 197–201.
- [115]- Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones DT (2004) The DISOPREDserver for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics* 20: 2138–2139.
- [116]- Bennett-Lovsey RM, Herbert AD, Sternberg MJE, Kelley LA (2008) Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70: 611–625.

- [117]- Wass MN, Kelley LA, Sternberg MG (2010) 3DligandSite: predicting ligand-sites using similar structures. *Nucleic Acids Research* 38: 469-473.
- [118] Wass MN, Sternberg MJ (2009) Prediction of ligand binding sites using homologous structures and conservation at CASP8. *Proteins* 77: 147-51.
- [119] López G, Ezkurdia I, Tress ML (2009) Assessment of ligand binding residue predictions in CASP8. *Proteins*, 779: 138-46.
- [120] Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363-71.
- [121] Ortiz AR, Strauss CE, Olmea O (2002) Mammoth (matching molecular models obtained from theory): An automated method for model comparison. *Protein Science* 11: 2606-21.
- [122] Zhang Y, Skolnick J (2005) TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score. *Nucleic Acids Research* 33: 2302-09.
- [123] Capra J, Singh M (2008) Characterization and prediction of residues determining protein functional. *Bioinformatics*. 24: 1473-1480.
- [124]- Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, Doerks T, Stark M, Müller J, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39: 561-568
- [125]- Pattin KA, Moore JH (2009) Role for protein-protein interaction databases in human genetics. *Expert Review in Proteomics* 6: 647–659.
- [126]- Emily M, Mailund T, Hein J, Schauer L, Schierup MH (2009) Using biological networks to search for interacting loci in genome-wide association studies. *European Journal of Human Genetics* 17: 1231–1240.
- [127]- Pujol A , Mosca R, Farres J, Aloy P (2010) Unveiling the role of network and systems biology in drug discovery. *Trends in Pharmacology Science* 31: 115–123.
- [128]- Klipp E, Wade RC, Kummer U (2010) Biochemical network-based drug-target prediction. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 511–516.
- [129]- Janga SC, Diaz-Mejia JJ, Moreno-Hagelsieb G (2010) Network-based function prediction and interactomics: The case for metabolic enzymes. *Metabolic Engineering*.
- [130]- Orth JD, Palsson BO (2010) Systematizing the generation of missing metabolic knowledge. *Biotechnology Bioengineering* 107: 403–412.

- [131]- Wang PI, Marcotte EM (2010) It's the machine that matters: Predicting gene function and phenotype from protein networks. *Journal of Proteomics* 73: 2277–2289.
- [132]- Lage K, Karlberg EO, Storling ZM, Olason PI, Pedersen AG, Rigina O, Hinsby AM, Tumer Z, Pociot F, Tommerup N et al. (2007) A human phenome-interactome network of protein complexes implicated in genetic disorders. *Nature Biotechnology* 25: 309–316.
- [133]- Orchard S, Kerrien S, Jones P, Ceol A, Chatr-Aryamontri A, Salwinski L, Nerothin J and Hermjakob H (2007) Submit your interaction data the IMEx way: a step by step guide to trouble-free deposition. *Proteomics* 7: 28–34.
- [134]- Salwinski L, Miller CS, Smith AJ, Pettit FK, Bowie JU, Eisenberg D (2004) The Database of Interacting Proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Research* 32: 449–451.
- [135]- Aranda B, Achuthan P, Alam-Faruque Y, Armean I, Bridge A., Derow C, Feuermann M, Ghanbarian AT, Kerrien S, Khadake J et al. (2010) The IntAct molecular interaction database in 2010. *Nucleic Acids Research* 38: 525–531.
- [136]- Ceol A, Chatr Aryamontri A, Licata L, Peluso D, Briganti L, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G (2010) MINT, the molecular interaction database: 2009 update. *Nucleic Acids Research* 38: 532–539.
- [137]- Guldener U, Munsterkotter M, Oesterheld M, Pagel P, Ruepp A, Mewes HW, Stumpflen V (2006) MPact: the MIPS protein interaction resource on yeast. *Nucleic Acids Research* 34: 436–441.
- [138]- Chautard E, Ballut L, Thierry-Mieg N, Ricard-Blum S (2009) MatrixDB, a database focused on extracellular protein-protein and protein-carbohydrate interactions. *Bioinformatics* 25: 690–691.
- [139]- Goll J, Rajagopala SV, Shiau SC, Wu H, Lamb BT, Uetz P (2008) MPIDB: the microbial protein interaction database. *Bioinformatics*, 24, 1743–1744.
- [140]- Breitkreutz BJ, Stark C, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Livstone M, Oughtred R, Lackner DH, Bahler J, Wood V et al. (2008) The BioGRID Interaction Database: 2008 update. *Nucleic Acids Research* 36: 637–640.
- [141]- Kanehisa M, Goto S, Furumichi M, Tanabe M, Hirakawa M (2010) KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Research* 38: 355–360.

- [142]- Matthews L, Gopinath G, Gillespie M, Caudy M, Croft D, de Bono B, Garapati P, Hemish J, Hermjakob H, Jassal B et al. (2009) Reactome knowledgebase of human biological pathways and processes. *Nucleic Acids Research* 37: 619–622.
- [143]- Karp PD, Ouzounis CA, Moore-Kochlacs C, Goldovsky L, Kaipa P, Ahren D, Tsoka S, Darzentas N, Kunin V, Lopez-Bigas N (2005) Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Research* 33: 6083–6089.
- [144]- Keshava Prasad,T.S., Goel,R., Kandasamy,K., Keerthikumar,S., Kumar,S., Mathivanan,S., Telikicherla,D., Raju,R., Shafreen,B., Venugopal,A. et al. (2009) Human Protein Reference Database – 2009 update. *Nucleic Acids Research* 37: 767–772.
- [145]- Tweedie S, Ashburner M, Falls K, Leyland P, McQuilton P, Marygold S, Millburn G, Osumi-Sutherland D, Schroeder A, Seal R et al. (2009) FlyBase: enhancing Drosophila Gene Ontology annotations. *Nucleic Acids Research* 37: 555–559.
- [146]- Rodriguez-Esteban R (2009) Biomedical text mining and its applications. *PLoS Computational Biology* 5: e1000597.
- [147]- Hoffmann R, Valencia A (2004) A gene network for navigating the literature. *Nature Genetics* 36: 664.
- [148]- Lewis AC, Saeed R, Deane CM (2010) Predicting protein-protein interactions in the context of protein evolution. *Molecular Biosystems* 6: 55–64.
- [149]- Skrabanek L, Saini HK, Bader GD, Enright AJ (2008) Computational prediction of protein-protein interactions. *Molecular Biotechnology* 38: 1–17.
- [150]- Huynen MA, Snel B, von Mering C, Bork P (2003) Function prediction and protein networks. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 191–198.
- [151]- Valencia A, Pazos F (2002) Computational methods for the prediction of protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 12: 368–373.
- [152]- D Kozakov, R Brenke, SR Comeau, S Vajda (2006) PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins* 65: 392-406.
- [153]- D Kozakov, D R Hall, D Beglov, R Brenke, SR Comeau, Y Shen, K Li, J Zheng, P Vakili, IC Paschalidis, S Vajda. (2010) Achieving reliability and high accuracy in automated protein docking: ClusPro, PIPER, SOU, and stability analysis in CAPRI rounds 13-19. *Proteins* 78, 3124-3130.
- [154]- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Research*

- [155] Slomianny MC, Dupont A, Bouanou F, Beseme O, Guihot AL, Amouyel P, Michalski JC, Pinet F (2006) Profiling of membrane proteins from human macrophages: comparison of two approaches. *Proteomics* 6: 2365–2375.
- [156] Perrot M, Sagliocco F, Mini T, Monribot C, Schneider U, Shevchenko A, Mann M, Jenö P, Boucherie H (1999) Two dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae* (update 1999). *Electrophoresis* 20: 2280–2298.
- [157] Patton WF (1999) Proteome analysis II. Protein subcellular redistribution: linking physiology to genomics via the proteome and separation technologies involved. *Journal of Chromatography* 722: 203–223.
- [158] Gorg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665–3685.
- [159] Hernaez ML, Ximenez-Embun P, Martinez-Gomariz M, Gutierrez-Blazquez MD, Nombela C, Gil C (2010) Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *Journal of Proteomics* 73: 1404-1409.
- [160]- Mason AB, Buckley HR, Gorman JA (1993) Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene. *Journal of Bacteriology* 175: 2632-2639.
- [161]- Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A (1996) Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *Journal of Infectious Diseases* 173: 684-90
- [162]- Nombela C, Gil C, Chaffin WL (2006) Non-conventional protein secretion in yeast. *TRENDS in Microbiology* 14: 15-21.
- [163] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101–2105.
- [164]. Pendrak M L, Klotz SA (1995) Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiology Letters* 129: 103–114.
- [165]. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Gozalbo MC, Martinez C (1998) Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *microbiology and molecular biology reviews* 62: 130-180.
- [166] Yang BY, Gray JSS, Montgomery (1996) The glycans of horseradish peroxidase. *Carbohydrate Research* 287: 203-212.

VI - ANEXOS

Anexo 1. Anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do genes que codificam as proteínas de *C. albicans* com afinidade ao polipéptido Blad que foram identificadas por espectrometria de massa.

Abreviaturas:

IDA- Inferred from Direct Assay (inferido a partir de ensaio direto)

IMP- Inferred from Mutant Phenotype (inferido a partir de fenótipo mutante)

IPI- Inferred from Physical Interaction (inferido a partir de interação física)

IEA- Inferred from Electronic Annotation (inferido a partir de notação electrónica)

ISS- Inferred from Sequence or structural Similarity (inferido a partir de similaridade de sequência ou estrutura)

EBI- European Bioinformatic Institute

NAS- Non-traceable Author Statement (afirmação de autor não detetável)

IGI- Inferred from Genetic Interaction (inferido a partir de interação genética)

ND- No Biological Data Available (dados biológicos indisponíveis)

1. Anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314).

1.1. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular (determinada manualmente) indica:

- ligação a ‘kininogen’ de elevado peso molecular (IDA)
- atividade de fosfopiruvato hidratase (IDA, ISS com *S. cerevisiae*: ENO1, *S. cerevisiae*: ENO2)
- ligação a proteína(s) (IPI com EBI: P00747)

1.2. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular (inferido por computação) indica:

- ligação ao ião magnésio (IEA com EBI: IPR000941, EBI: IPR020810, EBI: IPR020811)
- atividade de fosfopiruvato hidratase (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)

1.3. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação ao seu processo biológico (determinada manualmente) indica:

- resposta celular a estímulos bióticos (IMP)
- penetração (entry) no hospedeiro (IPI com EBI: P00747)
- crescimento filamentoso (IMP)
- crescimento filamentoso de uma população de organismos celulares em resposta a estímulo biótico (IMP)
- gluconeogénese (ISS com *S. cerevisiae*: ENO1)
- processo glicolítico (ISS com *S. cerevisiae*: ENO1, IMP)
- resposta de defesa do hospedeiro induzida pelo simbiote (IDA)

1.4. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação ao seu processo biológico (inferido por computação) indica:

- utilização de carbono (IEA com *A. nidulans*: acuN)
- processo glicolítico (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)
- regulação da fusão de vacúolos, não autofágica (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)

1.5. A anotação de GO do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (determinado de modo manual – manually curated) indica:

- superfície celular (IDA)
- citoplasma (IDA)
- região extracelular (IDA)
- parede celular do tipo fungo (fungal-type) (IDA)
- parede celular das hifas (IDA)
- intracelular (IDA)
- membrana (IDA)
- núcleo (IDA)
- complexo fosfopiruvato hidratase (ISS com *S. cerevisiae*: ENO1)

- parede celular da forma levedura (yeast form) (IDA)

1.6. A anotação de GO do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (high throughput) indica:

- membrana plasmática (IDA)

1.7. A anotação de GO do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (inferido computacionalmente) indica:

- vacuolo do tipo fungo (fungal-type) (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)
- mitocôndria (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)
- núcleo (IEA com *S. pombe*: ENO101)
- complexo fosfopiruvato hidratase (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)
- membrana plasmática (IEA com *S. cerevisiae*: ENO1)

1.8. A anotação de GO do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua participação em vias metabólicas na célula indica:

- gluconeogénese
- glicólise

2. Anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ENO1 de *C. albicans* (SC5314).

2.1. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular (determinada manualmente) indica:

- atividade (NAD) de álcool desidrogenase (NAS, ISS com *S. cerevisiae*: ADH1, IGI com *S. cerevisiae*: ADH1, *S. cerevisiae*: ADH3, *S. cerevisiae*: ADH2)
- metilglicoxal reductase (NADH dependente) (IDA)

- ligação a proteína(s) (IPI com EBI: P00747)

2.2. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular (inferido por computação) indica:

- atividade (NADPH) de carbonil redutase (IEA with *C. parapsilosis*: ADH1)
- atividade de transferase (IEA com EBI: IPR020843)
- ligação a íão zinco (IEA com EBI: IPR013149, EBI: IPR002085)

2.3. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação ao seu processo biológico (determinada manualmente) indica:

- processo glicolítico (NAS)
- resposta de defesa do hospedeiro induzida pelo simbiote (IDA)
- interação com hospedeiro (IPI com RefSeq Accession: NP_000292)
- formação de biofilme por espécie única no organismo hospedeiro (IMP)
- formação de biofilme por espécie única (IMP)

2.4. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação ao seu processo biológico (inferida computacionalmente) indica:

- processo de oxidação-redução (IEA com EBI: IPR013154, EBI: IPR013149, EBI: IPR002085)

2.5. A anotação de GO do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (determinado de modo manual – manually curated) indica:

- superfície celular (IDA)
- região extracelular (IDA)
- parede celular do tipo fungo (fungal-type) (IDA)
- parede celular das hifas (IDA)
- mitocôndria (ISS)
- parede celular da forma levedura (yeast form) (IDA)

2.6. A anotação de GO do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (high throughput) indica:

- membrana plasmática (IDA)

2.7. A anotação de GO do gene ADH1 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua participação em vias metabólicas na célula indica:

- degradação de etanol
- fermentação
- degradação de isoleucina
- degradação de leucina
- degradação oxidativa de etanol
- degradação de fenilalanina
- degradação de valina

3. Anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314).

3.1. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular (inferido por computação) indica:

- ligação ao ADP (IEA com *S. pombe*: atp2)
- ligação ao ATP (IEA com EBI: IPR000194)
- contribui para a atividade de transporte de prótons da ATP sintase, mecanismo rotacional (IEA com *S. cerevisiae*: ATP2, *S. pombe*: atp2)
- atividade de transporte de prótons da ATP sintase, mecanismo rotacional

3.2. A anotação de GO (Gene Ontology – Ontologia Génica) do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314) em relação ao seu processo biológico (inferida computacionalmente) indica:

- hidrólise de ATP acoplada ao transporte de prótons (IEA with EBI: IPR000793)
- síntese de ATP mitocondrial acoplado ao transporte de prótons (IEA with *S. pombe*: atp2)

3.3. A anotação de GO do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (determinado de modo manual – manually curated) indica:

- membrana (IDA)

3.4. A anotação de GO do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (high throughput) indica:

- superfície celular (IDA)
- membrana plasmática (IDA)

3.5. A anotação de GO do gene ATP2 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua localização na célula (inferido computacionalmente) indica:

- citoplasma (IEA com *C. glabrata*: ATP2)
- membrana externa da mitocôndria (IEA com *N. crassa*: atp-2)
- ATP sintase mitocôndrial transportadora de prótons, centro catalítico (IEA com *S. cerevisiae*: ATP2, *S. pombe*: atp2)

4. Anotações de Ontologia Génica (função molecular, processo biológico e localização celular) do gene TCD2 de *C. albicans* (SC5314).

4.1. A anotação de GO do gene TCD2 de *C. albicans* (SC5314) em relação à sua função molecular indica:

- atividade de oxidoreductase (inferido por computação).

4.2. A anotação de GO do gene TCD2 de *C. albicans* em relação ao seu processo biológico indica: processo de oxidação-redução (inferido por computação).

4.3. A anotação de GO do gene TCD2 de *C. albicans* em relação à sua localização na célula indica: desconhecido (determinado de modo manual – manually curated). A informação sobre a GO do gene TCD2 de *C. albicans* foi acedida no ‘site’ da ‘Candida Genome Database’.